

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Dpto. BIOLOGÍA MOLECULAR

***REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN
DE TIOCORALINAS
EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN.
ACTIVIDADES BIOLÓGICAS***

TESIS DOCTORAL

Fernando de la Calle Verdú

Julio 1998

REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TIOCORALINAS EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN.

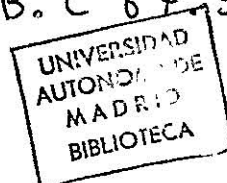
ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

Memoria redactada por Fernando de la Calle Verdú
para optar al grado de Doctor en Ciencia Biológicas
por la Universidad Autónoma de Madrid



Dirección:
Dr. Francisco Romero Millán
Dra. Isabel Reymundo Cuesta

R. B. C 67.590



Deseo expresar mi agradecimiento a todo el equipo humano de Pharma Mar, Instituto Biomar y Pharma Gen, sin el que no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Particularmente, a D. José María Fdez. Sousa, D. Dositeo Barreiro, D. Andrés Gómez, D. José Jimeno y D. José Luis Fdez. Puentes por la confianza y afecto que siempre han depositado en mí.

A Paco Romero, por su sobria dirección, sus enseñanzas y su buen humor al convertir la microbiología en matemáticas.

A Isabel Reymundo, por el tiempo que me ha dedicado, soportando mi desorden.

No quiero pasar por alto mi gratitud hacia Julia Pérez-Baz, del Inst. Biomar de León, por haber sido la primera en identificar la tiocoralina A, y por la acetilación de la tiocoralina C.

Gracias a Lola G^a Grávalos y su equipo por los ensayos antitumorales, a Cristina Acebal por su continua asesoría en microbiología, a Teresa G^a de Quesada por abrirme las puertas de su departamento y a todo el personal de Pharma Gen que tan estoicamente han soportado mi ignorancia.

A todos los químicos de Pharma Mar, especialmente a José Luis Chicharro y sus modelizaciones moleculares, y al resto por aguantar mi obcecación en resonancia.

Muy especialmente quiero agradecer a mis más cercanos compañeros, Jesús, Ángeles y Mary, por su ayuda y el cariño que nos procesamos.

Han sido muchos más los que han influido en la elaboración de este trabajo, a todos ellos mando mi más afectuoso recuerdo.

Aunque sin duda, quien más se merece mi admiración es mi mujer, Lourdes y mis hijos Óscar y Álvaro por tantas horas de soledad que han estado aguantando.

Esta tesis ha sido fruto de todos vosotros. Gracias.

A Lourdes

Abreviaturas

ACM2: *Micromonospora sp.ACM2*

AcN: acetonitrilo

Alm: almidón

ANA-1: ác. 4-hidroxiquinolín-2-carboxílico

ANA-2: ác. 3-hidroxi-2-quinolíncarboxílico

ANA-3 :ác. 4-metoxi-2-quinolíncarboxílico

ANA-4: ác. 7-metoxi-2-benzofuráncarboxílico

ANA-5: ác. 4,8-dihidroxiquinolín-2-carboxílico

ANA-6: ác. cromón-2carboxílico

ANA-7: ác. coumarín-3-carboxílico

ATCC: American Type Culture Collection

b₀ : coeficiente de regresión en (0,0,0,0)

BrEt: bromuro de etidio

BSA: albúmina de suero bovino

C: citosina

C.Conf.: coeficiente de confianza

CECT: Colección española de cultivos tipo

CH₂Cl₂: diclorometano

CONT: control

CHCl₃: cloroformo

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

E_x: efecto de una variable

E_d: efecto de variable placebo

EDTA: ácido etilén diamino tetraacético

EtOAc: acetato de etilo

EtOH: etanol

Fos: fostato dipotásico

g: gramo

G: guanina

h: hora

Hex: hexano

HPLC: high pressure chromatography

Kg: kilogramo

L-Cys: L-cisteína

L-Gly: L-glicina

L-Trp: L-triptófano

L-Tyr: L-tirosina

l: litro

Lev: levadura

Ln: logaritmo neperiano

M: molar

mg: miligramo

ml: mililitro

ML1: *Micromonospora sp.* ML1

mM: milimolar

nM: nanomolar

PAT: Potencia antitumoral

Pep: peptona

R: coeficiente de correlación múltiple

R²: coeficiente de regresión

RNA: ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

S: coeficiente de sedimentación

t: valor de Student

T: timina

TA: tiocoralina A

TB: tiocoralina B

TC: tiocoralina C

TCa: tiocoralina C acetilada

TE: tiocoralina E

TE: tampón tris-EDTA

TLC: thin layer chromatography

topoII: topoisomerasa tipo II

tRNA: ácido ribonucleico de transferencia

U: unidad de actividad enzimática

V: voltio

X_a: variables independientes

μl: microlitro

μg: microgramo

μm: micrometro

μM: micromolar

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- TRATAMIENTO ACTUAL DEL CÁNCER	1
1.2.- AGENTES ANTITUMORALES PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS	2
1.3.- ANTIBIÓTICOS QUINOXALÍNICOS Y DERIVADOS	4
1.3.1.- Microorganismos productores	5
1.3.2.- Condiciones de fermentación	6
1.3.3.- Estructuras moleculares	7
1.3.4.- Actividades biológicas	12
1.3.5.- Mecanismos de acción	15
1.4.- TIOCORALINA A	17
2.- OBJETIVOS	19
3.- MATERIALES	21
3.1.- MICROORGANISMOS	21
3.1.1.- Cepas aisladas por PharmaMar, S.A. productoras de tiocoralinas	21
3.1.2.- Microorganismos de colección utilizados	21
3.2.- LÍNEAS CELULARES TUMORALES	22
3.3.- REACTIVOS, MATERIAS PRIMAS, ENZIMAS Y SUSTRATOS	22
3.4.- MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS	23
4.- MÉTODOS	27
<u>Métodos microbiológicos</u>	27
4.1.- MÉTODOS TAXONÓMICOS COMPARATIVOS	27
4.1.1.- Utilización de fuentes de carbono	27
4.1.2.- Reacciones bioquímicas	29
4.1.3.- Sensibilidad a antibióticos	29
4.1.3.1.- Antibióticos comerciales	29
4.1.3.2.- Tiocoralina A	30
4.1.4.- Tolerancia a la salinidad	30

4.2.- FERMENTACIONES	31
4.2.1.- Fermentación primaria	31
4.2.1.1.- Mantenimiento y conservación de cepas	31
4.2.1.2.- Desarrollo de inóculos	31
4.2.2.- Fermentación de producción	32
4.2.2.1.- Mejora de medios	32
4.2.2.2.- Efecto de adiciones exógenas	33
4.2.2.2.1.- Adición de grupos cromóforos análogos	33
4.2.2.2.2.- Adición de aminoácidos	34
4.2.3.- Medida del crecimiento bacteriano	34
4.2.4.- Influencia de los componentes del medio sobre el crecimiento y la producción	34
4.2.4.1.- Método de Plackett y Burman	34
4.2.5.- Métodos de optimización de la producción por respuesta de superficie	36
4.2.5.1.- Optimización unidireccional dirigida (Método de Hendrix)	36
4.2.5.2.- Diseño compuesto centralizado (Método de Box-Wilson)	37
 <i>Métodos químicos</i>	 40
4.3.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PARA VALORACIONES	40
4.4.- EXTRACCIÓN DE CALDOS DE FERMENTACIÓN	41
4.5.- MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE TIOCORALINAS	43
4.5.1.- Cromatografía en columna	43
4.5.1.1.- Sílice en fase normal	43
4.5.1.2.- Sílice en fase reversa	45
4.5.1.3.- Cromatografía de filtración por LH-20	45
4.5.2.- Precipitación y cristalización.	45
4.6.- MÉTODOS ANALÍTICOS	46
4.6.1.- Cromatografía en capa fina (TLC) de tiocoralinas	46
4.6.2.- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de tiocoralinas	46
4.7.- DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SOLUBILIDADES	46

<i>Métodos de detección de la actividad biológica</i>	47
4.8.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	47
4.8.1.- Determinación de la concentración mínima inhibidora (MIC) en medio líquido	47
4.8.2.- Medida de los halos de inhibición del crecimiento en medio sólido	48
4.9.- ACTIVIDAD ANTITUMORAL	49
4.9.1.- Preparación de ensayos antitumorales	49
4.9.2.- Preparación de las muestras a ensayar	50
4.9.2.1.- Extractos	50
4.9.2.2.- Compuestos	50
4.9.3.- Cálculo de la potencia antitumoral (PAT)	50
 <i>Métodos de biología molecular</i>	 51
4.10.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE TOPOISOMERASA II	51
4.10.1.- Sin extracción del plásmido	51
4.10.2.- Con extracción del plásmido	51
 5.- RESULTADOS	 53
5.1.- COMPARACIÓN QUIMIOTAXONÓMICA DE CEPAS PRODUCTORAS DE TIOCORALINAS, TRIOSTINAS Y SANDRAMICINAS	53
5.1.1.- Utilización de fuentes de carbono y otras pruebas bioquímicas	53
5.1.2.- Sensibilidad a antibióticos	54
5.1.3.- Tolerancia a sales marinas	54
5.2.- FERMENTACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE TIOCORALINAS	55
5.2.1.- Efecto de nutrientes sobre el crecimiento y producción de las cepas productoras de tiocoralinas, triostinas y sandramicinas por la técnica de Plackett y Burman	55
5.2.1.1.- Crecimiento	55
5.2.1.2.- Producción	57
5.2.2.- Optimización del medio de producción según el modelo autodirigido de Hendrix de las cepas productoras de tiocoralinas	58

5.2.3.- Optimización del medio de producción según el modelo de diseño compuesto centralizado de Box-Wilson de las cepas productoras de tiocoralinas	61
5.2.3.1.- Cepa ML1	62
5.2.3.2.- Cepa ACM2	65
5.2.4.- Efecto de la adición de análogos del ácido 3-hidroxi-2-carboxílico y aminoácidos sobre la productividad de las cepas productoras de tiocoralinas	67
5.2.4.1.- Adición de grupos cromóforos análogos	67
5.2.4.2.- Adición de aminoácidos	69
5.3.- OBTENCIÓN DE NUEVAS TIOCORALINAS	71
5.3.1.- Extracción y purificación de tiocoralinas	71
5.3.2.- Estructuras químicas. Perfiles cromatográficos y solubilidades	73
5.4.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE TIOCORALINAS Y EQUINOMICINA	74
5.4.1.- Inhibición bacteriana en medio sólido	74
5.4.2.- Determinación MIC en medio líquido	75
5.5.- ACTIVIDAD ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> DE TIOCORALINAS Y EQUINOMICINA	76
5.6.- MECANISMO DE ACCIÓN DE TIOCORALINAS Y EQUINOMICINA	76
5.6.1.- Unión DNA-tiocoralinas	76
5.6.2.- Efecto sobre la topoisomerasa II	77
6.- DISCUSIÓN	79
6.1.- COMPARACIÓN TAXONÓMICA DE CEPAS PRODUCTORAS DE TIOCORALINAS, SANDRAMICINA Y TRIOSTINAS	79
6.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS NUTRIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE TIOCORALINAS, SANDRAMICINA Y TRIOSTINAS	80
6.3.- OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TIOCORALINAS Y ESTUDIO DE LAS INTERRELACIONES ENTRE NUTRIENTES	81

6.4.- EFECTO DE ADICIONES EXÓGENAS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE FERMENTACIONES DE CEPAS PRODUCTORAS DE TIOCORALINAS	84
6.5.- NUEVAS TIOCORALINAS: RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	86
6.6.- ESTUDIOS DE UNIÓN DE TIOCORALINAS AL PLÁSMIDO pBR322	87
6.7.- EFECTO DE BIS-INTERCALACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE TOPOISOMERASA II	88
6.9.- COMPARACIONES GENERALES ENTRE TIOCORALINA A Y EQUINOMICINA	89
7.- CONCLUSIONES	91
8.- BIBLIOGRAFÍA	93
9.- ANEXOS	
ANEXO 1.- Dendograma taxonómico de las cepas productoras de tiocoralina	
ANEXO 2.- Matrices empleadas en optimización unidireccional	
ANEXO 3.- Resultados de adiciones de análogos de grupos cromóforos y aminoácidos	
ANEXO 4.- Espectros de resonancia ^1H -RMN de tiocoralinas A, B, C, Ca y E	
ANEXO 5.- Espectros de resonancia ^{13}C -RMN de tiocoralinas A, B, C, Ca y E	

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- TRATAMIENTO ACTUAL DEL CÁNCER

La gran dificultad de las terapias existentes hoy en día radica en la necesidad de eliminación de todas las células cancerosas y en la especificidad de acción de los agentes anticancerígenos. La eliminación de todas las células alteradas es fundamental ya que las resistentes a tratamientos sufridos se volverán a multiplicar, creándose un tumor resistente al tratamiento aplicado. La especificidad de acción se basa en el reconocimiento preciso de aquellas células cancerosas, sin que pueda afectar a las normales.

Los métodos terapéuticos que se están utilizando e investigando, incluyen por sí solos o en combinación, la cirugía, radioterapia, terapias de bloqueo endocrino y suministro complementario de hormonas, inmunoterapia, terapia génica (supresión de la expresión del oncogen *ras* mutado, reexpresión del gen supresor *p53*, etc.). Pero, a pesar de los efectos secundarios presentados y la relativa poca selectividad de reconocimiento, es la quimioterapia la técnica más ampliamente utilizada en la actualidad.

Los mecanismos de acción de compuestos citotóxicos actualmente en uso, siguen la clasificación propuesta por el National Cancer Institute¹:

Agentes alquilantes: Unión covalente al DNA. Representados por cis-platino, mitomicina C, mostazas nitrogenadas, N-alquil-N-nitrosoureas, etc.

Agentes antimitóticos: Inhibición de la mitosis al interferir en la correcta funcionalidad de los microtúbulos; vincristina y vinblastina provocan la despolimerización; paclitaxel, docetaxel y taxol bloquean las células en anafase.

Inhibidores de las topoisomerasas I y II: Impiden el desenrollamiento y relajación de las cadenas de DNA, lo que se traduce en una inhibición de replicación y transcripción. La camptotecina es el inhibidor por excelencia de la topoisomerasa I. Los inhibidores de la topoisomerasa II se han clasificados (Foye, 1995) como intercalantes y no intercalantes. Entre los intercalantes se encuentran: actinomicina D, antraciclinas tipo doxorubicina y daunorubicina (de origen microbiano todos ellos); y entre los no-intercalantes, cuyo mecanismo de acción es el evitar la unión de las cadenas rotas por la topoisomerasa II: etopósido VP-16.

Antimetabolitos: Interfieren en la formación o utilización de metabolitos celulares. Algunos de ellos funcionan como sustratos o cofactores enzimáticos. Entre los inhibidores de la síntesis de pirimidinas se encuentran los derivados del 5-fluoruracilo, y ara-C y entre los inhibidores de purinas destacan 6-tioguanina, hidroxiurea, etc. Los inhibidores de la dihidrofolato reductasa son antagonistas clásicos del ácido fólico, como aminopterina, o antifolatos lipofílicos (no clásicos) como trimetexato y el piritrexeno.

¹ NCI; (NCI: <http://www.nci.nih.gov/>.) Mayo, 1998

Pero sin duda, cuando los nuevos agentes citostáticos **inhibidores de la invasividad** (inhibidores de proteasas, de movilidad celular o adhesión celular) como carboxiamidotriazol, o los **inhibidores de la angiogénesis** como la angiostatina, trombospondina, IFN- α , talidomida, etc., (Muñoz, 1997) lleguen con éxito a las últimas fases del desarrollo clínico, el NCI deberá ampliar su clasificación.

1.2.- AGENTES ANTITUMORALES PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS

Los actinomicetos forman el grupo productor más importante de metabolitos de uso clínico. Ellos producen las dos terceras partes de los antibióticos conocidos (Berdy, 1974). Son microorganismos procariotas, Gram positivos y formadores de micelio. A ellos y a los hongos se debe el descubrimiento de los antibióticos. El estudio de su genética molecular ha sido, durante años, la base del conocimiento de diversos procesos de regulación génica (Jiménez, 1990). Los grupos de compuestos producidos por ellos con actividad antitumoral más destacada, pueden ser resumidos en las siguientes familias:

Actinomicinas, aisladas de especies de *Streptomyces* en la década de los 40 (Waksman y Woodruff, 1940), siendo la **actinomicina C** la más utilizada para cáncer testicular y coriocarcinoma (Li et al., 1960).

Los derivados del grupo de las antraciclinas, **daunorrubicina**, producida por *Streptomyces peuceticus* (Grein et al., 1963; Di Marco et al., 1964) y su derivado menos tóxico, doxorubicina o **adriamicina** (Di Marco et al., 1975), compuesto que actualmente el NCI describe como inhibidor de Topoisomerasa II.

De *S. vorticellas* se aislaron las **bleomicinas A y B** (Umezawa et al., 1966), cuyo posible mecanismo de acción (Foye, 1995) se basa en la degradación directa del DNA cromosomal, sin causar grandes efectos secundarios. Se está estudiando su aplicación en tumores testiculares, así como en combinación con otras drogas para tratamientos de sarcoma de Kaposi (Foye, 1995).

La familia de las mitomicinas, producidas por *S. caespitosus* (Hata et al., 1956) y especialmente la **mitomicina C**, descrita por el NCI como agente alquilante, está siendo estudiada para reducir su alta toxicidad y poder ser utilizada contra adenocarcinomas (Kowal et al., 1983).

También de varias especies de *Streptomyces* se aislaron los derivados naturales de ácidos aureólicos: **mitramicinas** (Grundy et al., 1953) y **cromomicinas** que están siendo estudiados en Japón, en EEUU combinadas con 5-fluoruracilo + mitomicina A y en Rusia como agentes únicos frente a tumores testiculares (Foye, 1995), y cuyo mecanismo de acción puede ser debido a la inhibición enzimática de las DNA girasas (Stoerl et al., 1993).

Las **estreptozocinas** y **clorozotocinas**, producidas de *S. streptozoticus* (Herr et al., 1960) son agentes alquilantes bifuncionales y están incluidas en la lista del NCI (Mayo 1998).

Del grupo de las benzonaftopirranonas, las **crisomicinas V y M**, aisladas de *S.albaduncus* (Matson et al., 1989) y las **gilvocarcinas V y M**, producidas por *S.anandii* y *S.gilvotanareus* (Bartlitz et al., 1981) cuyos mecanismos de acción no son bien comprendidos aún, aunque podrían ser intercalantes de DNA, inhibiendo las Topoisomerasa II-dependientes de ruptura de DNA (Matson et al., 1989):

El compuesto **CC-1065**, proveniente de *S.zelensis* (Hanka et al., 1978) y las **pirindamicinas A y B**, producidas por otras especies de *Streptomyces* (Ohba et al., 1988), aunque presentaron buenos resultados en líneas tumorales resistentes a adriamicina, han sido descartadas por su elevada toxicidad.

La **netropsina**, aislada de *S.netropsis* (Finlay, et al., 1951) y la **distamicina A**, producida por *S.distillacus* (Arcamone et al., 1961) son oligopéptidos, no intercalantes, agentes alquilantes del DNA. Presentaron buenos resultados frente a leucemias resistentes L1210, aunque fallaron en su aplicación al ser muy tóxicos. La secuencia nucleotídica de reconocimiento está bien definida: d(CGCGAATCGCG)₂.

Del grupo de los diynenos (Foye, 1995), potentes antitumorales debido a su mecanismo de doble ruptura de las cadenas de DNA, destacan **calicheamicinas y dinemicina A**, producidas por especies de *Micromonospora*; **esperamicinas y veractimicinas** por especies de *Actinomadura* y las **neocarcinostatinas** por especies de *Streptomyces*.

Las **quinocarcina y quinocarcinol** fueron obtenidas a partir de *S.melanovinaceous* (Tomita et al., 1983), y aunque éste último no fue activo, el mecanismo de acción de la quinocarcina podría ser debido a la ruptura de DNA por generación de radicales libres (Tomita et al., 1984).

El numeroso grupo de antibióticos nucleósidos (Foye, 1995), cuyos microorganismos productores comprenden especies de *Streptomyces*, *Nocardia*, *Ampullariella* y *Actinomadura*, destacan por su actuación como antimetabolitos, por su similar estructura a bases nitrogenadas. Los compuestos más populares son **5-Azacitidina** (calificado por el NCI como antimetabolito RNA/DNA), **Ara-A** (antimetabolito DNA), **toyocamicina**, **sangivamicina**, **formicina A**, **neplanocina A** y hasta 20 compuestos más.

Las benzodiazepinas, agentes alquilantes de DNA (Foye, 1995), formado por una docena de compuestos, cuyos productores son especies de *Micromonospora* y *Streptomyces*, incluyen compuestos como **antramicina**, **sibiromicinas**, **neotamicinas A y B**, etc. Sin embargo, no aparecen como destacados candidatos a desarrollo clínico por el NCI.

El grupo de las **saframicanas y safracinas** (Ikeda et al., 1983-b), están producidas por diferentes microorganismos. Casi todas las saframicanas son producidas por cepas de *Streptomyces lavandulae* (Arai et al., 1980), excepto las Mx1 y Mx2, que se obtuvieron de *Myxococcus xanthus* (Trowitzsch-Kienast et al., 1988). Las safracinas provienen de la bacteria Gram negativa *Pseudomonas fluorescens* (Ikeda et al., 1983-a, Meyers et al., 1983). Las diferentes potencias antitumorales (Kishi et al., 1984) encontradas dentro de las primeras, se deben a cambios del radical del carbono 21, donde las más activas poseen grupos ciano o hidroxilo, por lo que podrían ser claramente alquilantes del DNA (Ishiguro et al., 1981), además de la unión del grupo hidroquinona a un posible d(ATGCAT)₂ (Lown et al., 1982; Hill et al., 1991), hecho que parece estar muy

relacionado con el mecanismo de unión de la ET-743 al DNA (*Pommier et al., 1996*). Este último compuesto, ET-743, perteneciente a la familia de compuestos denominados ecteinascidinas (*Rinehart et al., 1990 Rinehart & Holt, 1992*), ha sido aislado de la ascidia *Ecteinascidia turbinata*. La gran similitud de estas estructuras a saframycin y saframycin, sugiere un posible origen procarionte de las ecteinascidinas (*Bernan et al., 1997; Faulkner, 1993; Pawilk, 1993; Shimizu, 1993*). Recientemente se ha logrado secuenciar los genes implicados en la síntesis de la péptido sintetasa de la saframycin (*Pospiech et al., 1995, Pospiech et al., 1996*), lo que será de ayuda para localizar dicha enzima en posibles simbioses.

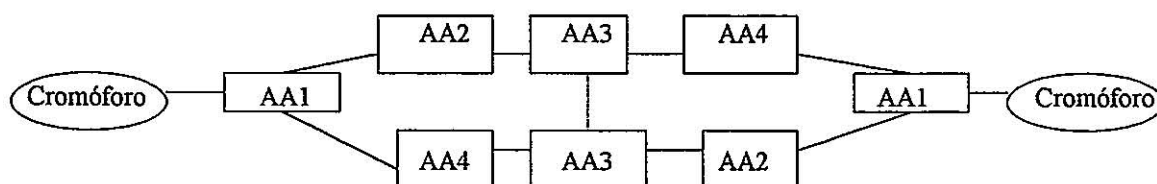
Por último, el grupo de bis-intercalantes de DNA, antibióticos quinoxalínicos y derivados quinolínicos, incluida la tiocoralina A, compuesto que PharmaMar espera introducir próximamente en ensayos clínicos.

1.3.- ANTIBIÓTICOS QUINOXALÍNICOS Y DERIVADOS

Características generales de los compuestos quinoxalínicos y derivados quinolínicos:

- Están formadas por cadenas de depsipéptidos (octapéptidos o decapeptidos) ciclados, con dos grupos cromóforos en sus extremos.
- Están producidos por bacterias Gram positivas pertenecientes al orden *Actinomycetales*.
- Presentan un marcado efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas, aunque no son buenos antifúngicos ni inhibidores del crecimiento de Gram negativos.
- Son definidos como antitumorales por su efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales, especialmente frente a líneas leucémicas de ratón y de melanoma B16.
- Han sido descritos como bis-intercalantes del DNA debido a la configuración presentada en forma de U, donde los grupos cromóforos de estos compuestos se intercalan en la doble cadena del DNA mientras que los aminoácidos se unirían no covalentemente a las bases nitrogenadas.

Fig.11.- Estructura de los compuestos quinoxalínicos octapéptidos y derivados:



1.3.1.- Microorganismos productores

Taxonomía

Las cepas bacterianas productoras de antibióticos quinoxalínicos y derivados no forman un grupo taxonómico relacionado, ni siquiera en los productores de tiocoralinas, ya que si bien es cierto que microorganismos de la familia *Micromonosporaceae* producen tiocoralinas y sandramicina, otro organismo perteneciente a la familia *Streptomycetaceae*, *Streptomyces gangtokensis* sp. A22179, también produce el compuesto BE-22179, idéntico a la tiocoralina C (TC) de *Micromonospora* sp. ML1. El resto de actinomicetos productores de este tipo de compuestos abarca muy diferentes géneros, como *Nocardioides*, *Sebekia benihana* (Linghan et al., 1996), *Streptomyces-Streptoverticillium*, y *Actinomadura*.

Tabla 11.- Microorganismos productores

Microorganismo	Compuestos	Fuente
<i>Actinomadura luzonensis</i> G455-101	Luzopeptinas A,B, C y D	Tomita et al., 1980
<i>Micromonospora</i> sp. C39500	Korkomicinas A,B,C,D,E,F y G	Lam et al., 1995
<i>Micromonospora</i> sp. ACM2 <i>Micromonospora</i> sp. ML1	Tiocoralina A	PharmaMar Aislados en 1989 y1992
<i>Nocardioides</i> sp. (ATCC 39419)	Sandramicina	Matson et al., 1989
No identificado MA 7095 (ATCC 55599)	Quinoxapeptinas A y B	Lingham et al., 1996
<i>Streptomyces album</i> Q132-6	Quinaldopeptinas Ay B	Toda et al., 1990
<i>Streptomyces gangtokensis</i> sp. A22179	BE-22179	Okada et al., 1994
<i>Streptomyces aureus</i> <i>S.echinatus</i> <i>S.flaveolus</i> , <i>S.griseolus</i> , <i>S.flavochromogenes</i> <i>S.albus</i>	Quinomocinas A(equinomicina),B,B ₀ ,C,D,E 1QN ^a , 2QN ^a ,1QCl ^a , 2QCl ^a	Yoshida et al., 1961 Corbaz et al., 1957 Otsuka et al., 1966
<i>Streptomyces triostinicus</i> (ATCC 21043)	Triostinas A, B,B ₀ y C 6CITrA ^b , 6BrTrA ^b , 7CITrA ^b , 3NTrA ^b , 2QTrA ^b	Kuroya et al., 1961 Shōji et al., 1961 Cornish et al., 1983
<i>Streptomyces braegensis</i> ssp. Japonicus N617-29	UK-63,052 , UK-63,662 UK-63,598	Rance et al., 1989

^aCompuestos obtenidos por biosíntesis dirigida de la cepa *S.echinatus* A8331 (Gauvreau & Waring, 1984)

^bSustituciones de los grupos cromóforos de triostina A por biosíntesis dirigida de la cepa *S.triostinicus*. 6CITrA (Bis-6-clorotriostina A); 6BrTrA (Bis-6-bromotriostina A); 7CITrA (Bis-7-clorotriostina A), 3NTrA (Bis-3-aminotriostina A), 2QTrA (Bis-quinolin-triostina A)

La taxonomía empleada para la identificación de las bacterias productoras de tiocoralinas, cepas ML1 y ACM2, fue realizada por análisis morfológicos, quimiotaxonómicos y culturales y se describió en la tesis doctoral de Espliego en 1996, en la que también se realizó un estudio filogenético por secuenciación parcial del RNA ribosómico 16S.

Aislamiento

Hábitat: Aunque la mayoría de los microorganismos productores fueron aislados directamente de muestras de suelo², las productoras de tiocoralinas lo fueron de organismos marinos (ML1 de un molusco y ACM2 de un coral).³

Situación geográfica: Todas las productoras de tiocoralinas se han localizado en el área de las costas del Océano Índico, en Mozambique, excepto el productor del BE-22179 que fue obtenido en muestras de suelo de Japón (*Okada et al.*, 1994). El resto de especies productoras de los antibióticos relacionados a las tiocoralinas tienen diversos orígenes: Alaska, Angola, Japón, Méjico, Australia, islas Canarias, India, etc.

1.3.2.- Condiciones de fermentación

Las fuentes de carbono descritas, utilizadas en los medios de fermentación para la producción de compuestos quinoxalínicos se basan en dextrosas (luzopeptinas), maltosa (quinomicinas y triostinas), lactosa (quinaldopeptinas), mezclas de glucosa/almidón (korkomicinas, BM-22179, tiocoralinas) y almidones (quinoxapeptinas, UK's, quinaldopeptinas).

Las fuentes nitrogenadas abarcan una gran diversidad, desde fuentes inorgánicas para la obtención de equinomicina y triostinas, hasta aceites de linaza (sandramicina), harinas de avena (luzopeptinas), soja (UK's), maíz (BM-22179, UK's), levaduras (luzopeptinas, tiocoralinas), extractos hidrosolubles de hígado (sandramicina y korkomicinas), PharmaMedia (korkomicina, sandramicina), etc.

Ninguna sal ni otros componentes de los medios de fermentación necesarios para el crecimiento aparecen descritos como claros estimulantes de la producción.

La temperatura empleada durante el proceso está en el habitual rango de 27 a 29°C.

No se observan especiales requerimientos de oxigenación ni mantenimiento de pH.

Las adiciones descritas durante el proceso fueron:

- Adición de 0.1 mM de L-valina para la estimulación de la producción de korkomicina A⁴, aunque en éste caso, no aumenta la cantidad de korkomicinas, sino que hay una desviación hacia la korkomicina A y un descenso en la producción de las demás.
- Adición de 0.25% de extracto de hígado para la hiperproducción de korkomicinas⁵

² Excepto el productor de quinoxapeptinas, que fue aislado de la corteza de *Betulia papyrifera* (*Lingham et al* 1996)

³ Últimamente, personal del I. Biomar ha aislado dos cepas productoras de equinomicina de origen marino, aisladas de un crustáceo y de un alga (*Cañedo* 1998, comunicación personal).

⁴ Existen 7 tipos de korkomicinas, dependiendo de las sustituciones aminoácidas de los grupos tetrahidropirizadinas (*Lam et al.*, 1995)

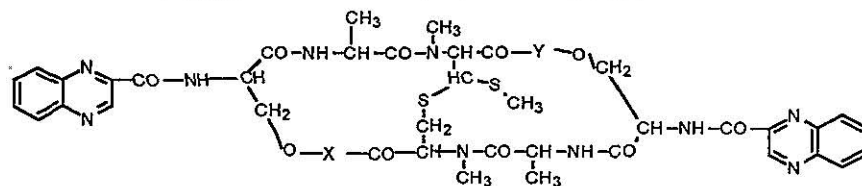
⁵ Tal vez debido a la riqueza en vitamina B₁₂, ya que ésta podría funcionar como transportador de grupos metilos para N⁵-metil-tetrahidrofolato, el cual podría metilar la homocisteína a la forma L-metionina, deduciéndose que la L-metionina podría ser precursor del grupo de korkomicinas. (*Lam et al.*, 1995).

- Adición de grupos cromóforos análogos a los de equinomicina (*ácido quinoxalín-2-carboxílico*). Gauvreau y Waring publicaron en 1984 un trabajo basado en la capacidad del *Streptomyces echinatus* A8331 para asimilarlos. Probaron con 32 ácidos aromáticos como potenciales sustratos, 16 de ellos no tuvieron claros efectos sobre crecimiento y producción, 5 estimularon la síntesis antibiótica, mientras que 11 resultaron inhibidores. Asimismo, probaron con grupos derivados del ácido quinolín-2-carboxílico (el mismo que poseen tiocoralinas, sandramicina, Uk's, luzopeptinas y quinaldopeptinas), aislando 2 nuevos compuestos, derivados del ácido quináldico (1QN y 2QN).
- Suplementación con ácidos quinoxalínicos sustituidos (*ácido 6-cloro-quinoxalín-2-carboxílico*, *ácido 7-cloroquinoxalín-2-carboxílico*, *ácido 6-bromoquinoxalín-2-carboxílico*; *ácido 3-aminoquinoxalín-2-carboxílico* y *ácido quinolín-2-carboxílico*) a cultivos de *Streptomyces triostinicus* (Cornish et al., 1983), con lo que consiguieron purificar los nuevos derivados de triostinas, que habían incorporado, sin variar, los grupos cromóforos adicionados.

1.3.3.- Estructuras moleculares

- A partir del principal compuesto de esta serie, la equinomicina (Fig. 1.2), y por sustituciones en X e Y, se da lugar a las demás quinomicinas. El esqueleto depsipeptídico está formado por dos moléculas de D-serina, dos de L-alanina, N-metil-cisteína, dimetil-cisteína y dos de L-N-metil-valina. Sus grupos cromóforos están formados por dos unidades de ácido quinoxalínico. Otra característica es la presencia de dos puentes tioacetales intramoleculares (Martin et al., 1975).

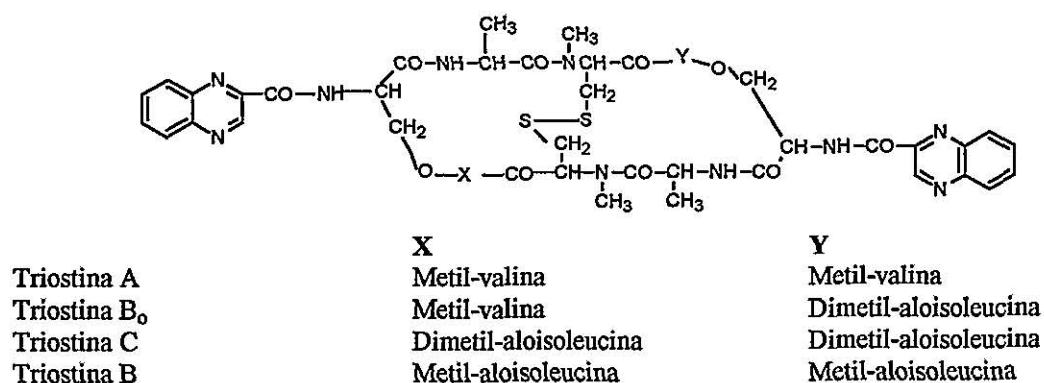
Fig.1.2.- Estructura del grupo de las quinomicinas



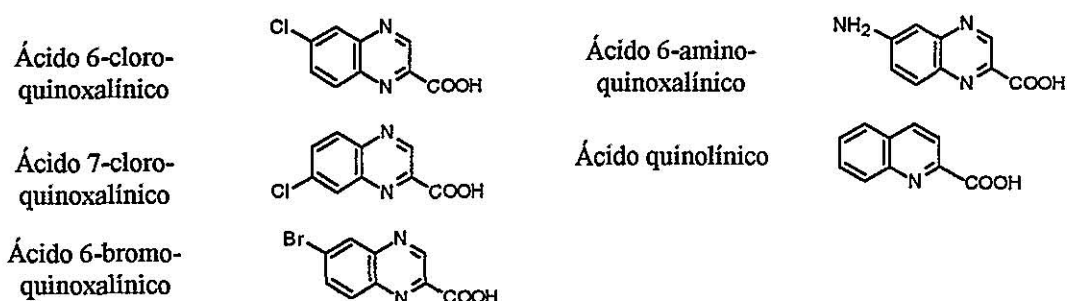
	X	Y
Equinomicina (Quinomicina A)	Metil-valina	Metil-valina
Quinomicina B ₀	Metil-valina	Dimetil-aloisoleucina
Quinomicina C	Dimetil-aloisoleucina	Dimetil-aloisoleucina
Quinomicina D	Metil-valina	Metil-aloisoleucina
Quinomicina B	Dimetil-aloisoleucina	Metil-aloisoleucina
Quinomicina E	Dimetil-aloisoleucina	Dimetil-aloisoleucina

Los derivados obtenidos por suplementación de grupos cromóforos (Gavreau y Waring, 1984), son sustituciones de los ácidos quinoxalínicos por quinolínicos (1QN y 2QN).

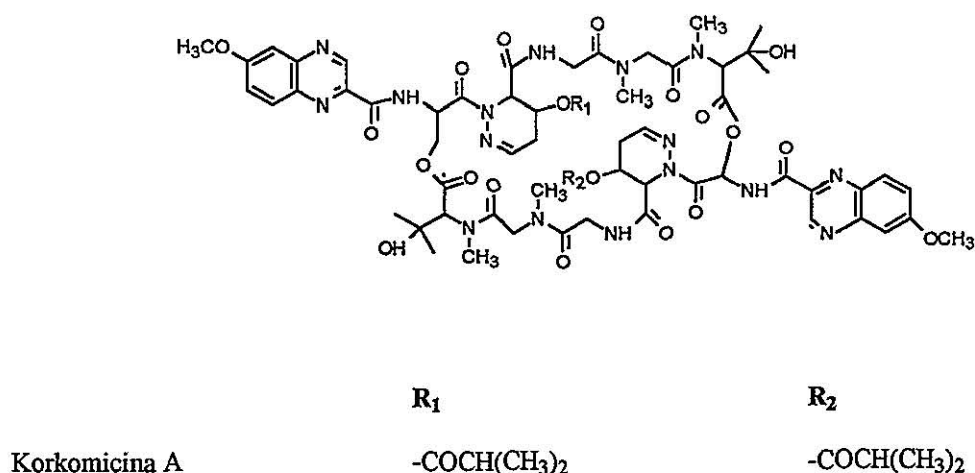
Las **triostinas** presentan exactamente la misma estructura peptídica, pero con enlace disulfuro entre las *N-metil-cisteínas* (Otsuka et al., 1965)

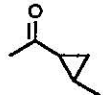
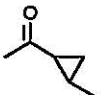
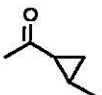
Fig. 1.3.- Estructura del grupo de las triostinas

Los compuestos con derivados en los cromóforos, obtenidos por suplementación en cultivo, presentaron exactamente el mismo esqueleto peptídico que la triostatina A pero con los siguientes derivados quinoxalínicos (*Cornish et al.*, 1983)



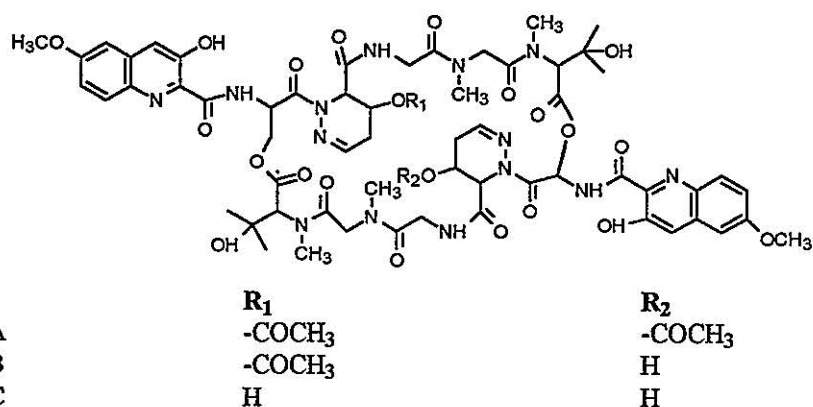
- Las **korkomicinas** y **quinoxapeptinas** comparten el mismo esqueleto estructural, formado por dos moléculas de D-serina, dos β-hidroxi-N-metil-valina, dos sarcosina, dos L-glicina y dos tetrahidroxipiridazina, pero diferenciándose en la sustitución de los radicales de éstas últimas (*Lam et al.*, 1995, *Lingham et al.*, 1996). Por otro lado, estas moléculas presentan grupos cromóforos sustituidos del ácido quinoxalínico, mientras que no presentan puentes intramoleculares.

Fig. 1.4.- Estructura de los grupos de korkomicinas y quinoxapeptinas

Korkomicina B	-COCH ₂ CH(CH ₃) ₂	-COCH(CH ₃) ₂
Korkomicina C	-COCH ₂ CH(CH ₃) ₂	-COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Korkomicina D	-COCH ₂ CH ₃	COCH ₃
Korkomicina E	-COCH(CH ₃) ₂	-COCH ₂ CH ₃
Korkomicina F	-COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃
Korkomicina G	-COCH ₂ CH ₃	-COCH ₂ CH ₃
Quinoxapeptina A		
Quinoxapeptina B	-COCH ₃	

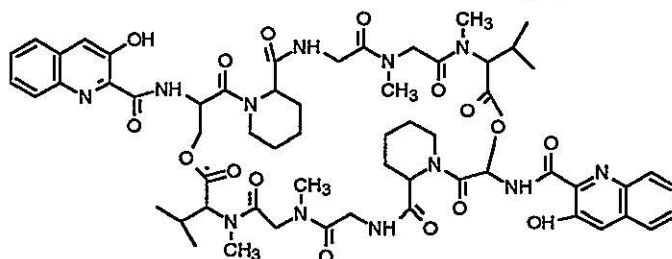
- Las **luzopeptinas** presentan idéntica estructura peptídica pero con grupo cromóforo derivado del ácido quináldico:

Fig. 1.5.-Estructura del grupo de las luzopeptinas



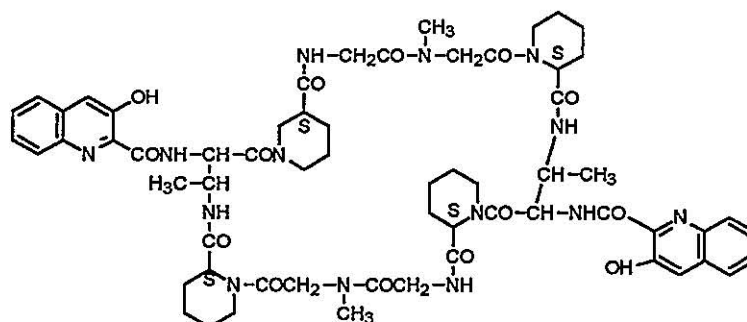
- Recientemente se ha conseguido la síntesis química total de la **sandramicina** (Boger *et al.*, 1996; Boger *et al.*, 1993), aislada por Matson y colaboradores en 1989 a partir de *Nocardiodex sp* ATCC 39419. El esqueleto peptídico lo forman dos moléculas de D-serina, dos N-metil-valina, dos sarcosinas, dos L-glicina y dos moléculas de ácido pipercolico. Los grupos cromóforos son ácidos 3-hidroxiquináldicos. Tampoco existe puente intramolecular.

Fig. 1.6.- Estructura de la sandramicina



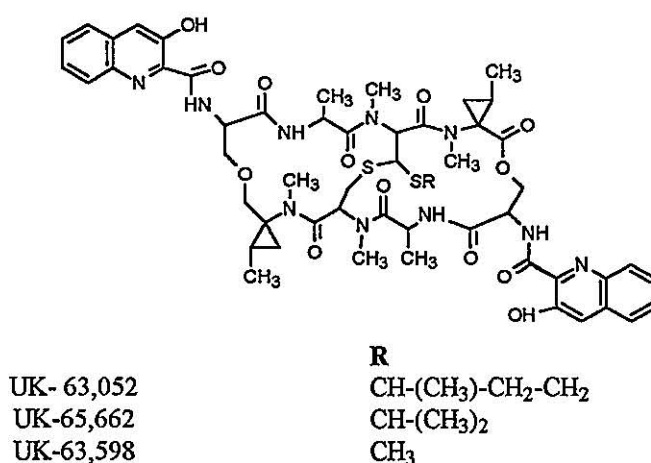
- Grupo de las **quinaldopeptinas**. Sólo presentan enlaces peptídicos, sin ningún tipo de puente intramolecular entre las cadenas. Los grupos cromóforos son 3-hidroxiquináldicos. Las unidades de D-serina han sido sustituidas por dos unidades de ácido D-eritro- α,β -diaminobutírico, además de dos sarcosina, dos L-glicina y cuatro de ácido pipercolico (*Toda et al.*, 1990). El derivado diacetilado presenta mejor solubilidad.⁶

Fig. 1.7.- Estructura de las quinaldopeptinas



- Grupo de las **UK's**. Su estructura peptídica es similar a equinomicina, salvo que tiene sustituciones en los restos de N-metil-valina, y los grupos cromóforos son ácidos quináldico (3-hidroxiquinolín-2-carboxílicos). Como en la equinomicina, presenta dos moléculas de serina, dos alanina, dos N-metil-cisteína, dos dimetil-cisteína y enlace tioacetal.

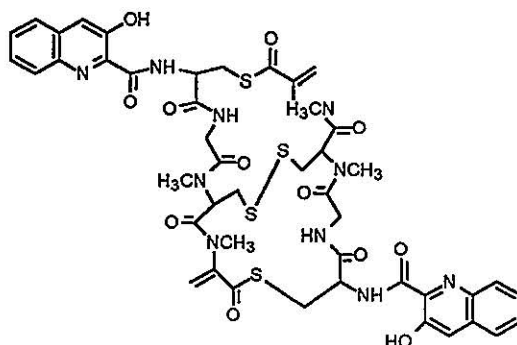
Fig. 1.8.- Estructura de los compuestos UK's



⁶ El gran inconveniente, general a todos los compuestos quinoxalínicos o quinolínicos en mayor o menor medida es su deficiente solubilidad en sistemas acuosos o alcohólicos (*Alfredson et al.*, 1990 ; *Alfredson et al.* 1991)

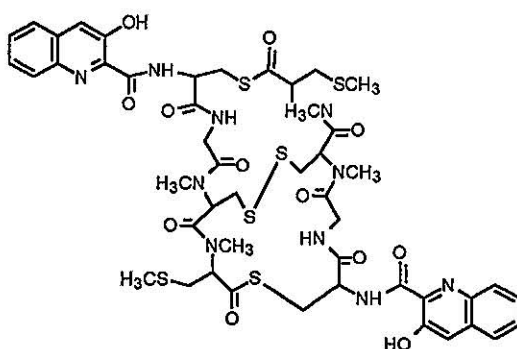
Compuesto **BE-22179**. Descrito como fuerte inhibidor de la actividad topoisomerasa II con IC_{50} de $0.034 \mu M$ (Yoshinari *et al.*, 1994). Su estructura es idéntica a la tiocoralina A, salvo que presenta sustituidos los S-metilos por dobles enlaces (Okada *et al.*, 1994). Presenta dos moléculas de ácido 3-hidroquinolín-2-carboxílico, dos cisteínas, dos glicinas, dos N-metil-dihidroalaninas y dos N-metil-cisteínas⁷. El enlace presente entre las N-metil-cisteínas es un puente disulfuro.

Fig. 1.9.- Estructura del compuesto BE-22179



- **Tiocoralina A**: Descrita por Pérez-Baz (Patente PharmaMar en 1994; descrita su elucidación en 1997), está formada por dos moléculas de ácido 3-hidroquinolín-2-carboxílico, dos cisteínas, dos glicinas, dos N-metil-cisteína, dos N-S-dimetil-cisteína y enlace disulfuro entre los restos de N-metil-cisteína.

Fig. 1.10.- Estructura de la tiocoralina A



⁷ Aunque Okada lo describe en 1994 como 2x N,N'-Di-MeCys, los datos espectroscópicos encajan mejor a 2xN-MeCys.

1.3.4.- Actividades biológicas

Actividad antibacteriana

En términos generales, todos estos compuestos presentan una marcada actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas, tanto aeróbicas como anaeróbicas, pero no son inhibidores tan fuertes de crecimiento frente a Gram negativos ni hongos⁸.

El análisis comparativo de los índices de concentraciones mínimas inhibitoras (MIC) queda reflejado en la Tabla 1.2:

Tabla 1.2.- Actividad antimicrobiana de compuestos quinoxalínicos y quinolínicos (MIC como µg/ml)

Compuestos	Organismos				
	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococ. Aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Equinomicina	0.0063	<0.001 a 0.049	0.012 a 0.031	1.6 a 12.5	>100
Quinomicina C	nd	0.0156	0.031	50	>100
Bis-quinolín-equinomicina	nd	0.25	0.156	12.5	>100
Triostina A	nd	0.0625	0.625	>100	>100
Triostina C	nd	0.0156	0.078	>100	>100
Bis-quinolín-triostina A	nd	2	10	>100	>100
Bis-6-cloro-triostina A	nd	0.156	1.25	>100	>100
Bis-6-bromo-triostina A	nd	nd	0.156	>100	>100
Bis-7-cloro-triostina A	nd	>100	>100	>100	>100
Luzopeptina A	0.2	0.2 a 0.4	0.1 a 0.2	12.5 a >100	>100
Luzopeptina B	0.2	1.6	0.8	>100	>100
Luzopeptina D	6.3	6.3	6.3	>100	>100
Sandramicina	nd	0.024	0.012	12.5	nd
Quinaldopeptina	0.2	0.4	0.4	3.1	>100
Diacetilquinaldopeptina	0.4	0.8	0.8	3.1	12.5
Korkomicina A	nd	nd	0.13	>125	>125
UK 63,052	nd	nd	1.56	>100	>100
UK 65,662	nd	nd	<0.20	>100	>100
UK 63,598	nd	nd	<0.20	50	>100
BE-22179	nd	0.2	0.2	>100	>100
Tiocalina A	0.03	0.05	0.05	>100	>100

nd. (No determinado)

Actividad antitumoral *in vivo*

Aunque todos los compuestos representados anteriormente presentan actividad citotóxica frente a líneas celulares tumorales, solamente la equinomicina ha llegado a ser probada como agente quimioterapéutico en fase clínica I (Pazdur *et al.*, 1987), aunque posteriormente fue retirado por su severa toxicidad (Foster *et al.*, 1986). Por otro lado,

⁸ Excepto el dato publicado por Toda *et al.*, 1990, donde describe la quinaldopeptina como activa frente a *Cryptococcus neoformans* D49)

la complejidad de parámetros empleados en los estudios preclínicos, en lo que a formulación, administración, dosificación, toxicidad y eficacia se refieren, hacen que los estudios comparativos sean complicados.

Los tipos de implantes en ratón más utilizados se realizan provocando tumores por inoculación de las células de leucemia de ratón P388 y L1210, melanoma B16 y carcinoma humano pulmonar de Lewis, de colon y de mama CD₈ F₁. Los parámetros generales de eficacia vienen determinados por el balance T/C x100, donde T es el número de ratones tratados y C los controles sin administración de droga, siendo un valor de >125% considerado como dosis eficaz. El término MED define la dosis mínima eficaz y MTD es la máxima dosis tolerada (toxicidad). La vía de administración suele ser intraperitoneal y la dosificación puede ser desglosada en tres esquemas: dosis única, días alternos o diaria durante siete a nueve días.

La preclínica realizada con la equinomicina concluyó con buenos resultados de efectividad frente al melanoma de ratón B16 (Dosis efectivas: 240 µg/Kg para una sola dosis; 60 µg/Kg durante 5 días y 30 µg/Kg x 9 días (T/C 160%, 164% y 161%, respectivamente), moderada acción frente a leucemia de ratón P388 y sin efectividad en leucemia de ratón L1210⁹, ni en implantes de células tumorales humanas. Los índices de toxicidad fueron determinados en valores (MTD) cercanos a 300 µg/Kg por inyección única y 150 µg/Kg durante 5 días consecutivos (Foster *et al.*, 1986).

Los datos referidos a la luzopeptina A fueron: P388 (Dosis más efectiva: 30 µg/Kg x9 días consecutivos (T/C 200%) y MED 10 µg/Kg), L1210 (Dosis más efectiva: 30 µg/Kg (150%)), carcinoma humano Lewis (30 µg/Kg y 232%), B16 (30 µg/Kg y 214%). La toxicidad de una sola dosis se estableció en 130 µg/Kg La luzopeptina B presentó MTD en 180 µg/Kg y la luzopeptina C, la más tóxica, en 800 µg/Kg. (Ohkuma *et al.*, 1980).

Los valores de korkomicina A frente a P388 fueron: (T/C 145%) entre 500 y 200 µg/Kg/inyección. La toxicidad se presentó a 700 µg/Kg Similar valoración se determinó para el carcinoma pulmonar humano Madison 109 (Lam *et al.*, 1995).

La sandramicina, frente a P388 presentó 200 µg/Kg/inyección a una sola dosis (T/C 161%) y toxicidad a 3.2 mg/Kg/inyección (Matson *et al.*, 1989).

La quinaldopeptina se ensayó frente a P388, siendo dosis efectiva a 30 µg/Kg/dosis única (T/C 141%) y una MED localizada en 10 µg/Kg (T/C 130%) (Toda *et al.*, 1990).

El compuesto BE-22179 mostró efecto (T/C 130%) a 16 µg/Kg en una única dosis, siendo el valor más óptimo (T/C 294%) a 125 µg/Kg y presentando toxicidad (T/C 33%) cuando se inoculara 1 mg/Kg (Okada *et al.*, 1994).

⁹ Curiosamente, aunque la equinomicina presenta una excelente IC₅₀ (concentración a la cual se produce la inhibición del 50% de la población celular) frente a la línea de leucemia de ratón L1210 *in vitro* (IC₅₀ 0.56nM, Yoshinari *et al.*, 1994), no fue evaluada como activa *in vivo* frente al mismo tipo de leucemia (Foster *et al.*, 1986).

Actividad inhibidora de la transcriptasa inversa (RT)

Como consecuencia de la búsqueda de posibles inhibidores de la transcriptasa inversa de HIV (HIV-RT) que Bristol Mayers realizó (*Inouye et al.*, 1987), donde no sólo se seleccionaron aquellos compuestos inhibidores de la enzima del virus de la mieloblastosis de ave (AMV-RT), sino que no deberían, además, mostrar elevado efecto citotóxico frente a las líneas huésped (linfosarcoma de ratón L5178Y), fueron descartadas la equinomicina (IC₅₀ 0.003 µg/ml), la triostina A (por los bajos índices de inhibición de la transcriptasa inversa (RT) y las luzopeptinas A (IC₅₀ 0.003 µg/ml) y B (IC₅₀ 0.016 µg/ml). Sin embargo, la luzopeptina C fue seleccionada, (junto a sakyomicina y adriamicina) como potencial candidato a ser probado frente a HIV-RT por su total inhibición de la replicación y su baja citotoxicidad (IC₅₀ 0.8 µg/ml). Los valores de inhibición de HIV-RT en células MT-4 mostraron para luzopeptina C una clara inhibición a alta concentración de la droga (2.5 a 5 µg/ml), sin afectar a la viabilidad celular, en contraste con sakymicina y adriamicina que fueron más citotóxicas.

Dos años después, la compañía SmithKline (*Take et al.*, 1989), realizó una amplia comparación entre inhibidores específicos de AMV-RT, HIV-RT y sus efectos frente a DNA polimerasas α y β . De sus datos se desprende que las luzopeptinas inhibieron los cuatro sistemas enzimáticos con los siguientes valores: luzopeptina A mostró un 68% de inhibición a 10 µg/ml y 85% a 50 µg/ml, luzopeptina B 95% y 100% y luzopeptina C 100% en ambas concentraciones sobre HIV-RT¹⁰. Frente a AMV-RT, la luzopeptina A inhibió en un 89% a 10 µg/ml y 100% a 40 µg/ml, luzopeptina B 97% y 96% y luzopeptina C 100% en ambas concentraciones. El efecto sobre DNA polimerasas¹¹ fue claro: inhibiciones entre 98% y 100% a 10 µg/ml y 50 µg/ml en todos los casos, lo que demostró un efecto no específico.

Sin embargo, tanto equinomicina, como triostina A no mostraron efecto inhibidor frente a AMV-RT, por lo que junto a otros antibióticos peptídicos, no fueron ensayados en otros sistemas enzimáticos.

Lingham y sus colaboradores (1996) describieron a las quinoxapeptinas A, B y a la luzopeptina A como fuertes inhibidores de la transcriptasa inversa de HIV-1 y HIV-2, con unos valores de IC₅₀ de 4 nM, 10 nM y 7 nM respectivamente, frente a HIV-1 RT, y de 40 nM, 100 nM y 68 nM frente a HIV-2 RT. Determinaron que ese mecanismo de actuación se debía a inhibición no-competitiva (K_i de 18 y 22 nM de quinoxapeptina A frente a HIV-1 RT y HIV-2 RT respectivamente) y que presumiblemente, la droga se intercala con el complejo *template/primers*¹² no dejando actuar a las enzimas (mecanismo similar a compuestos tipo acridina (*Cellai et al.*, 1994))

¹⁰ Los *template/primers* de HIV-RT y AMV-RT fueron Poly(rA)/oligo(dT)

¹¹ Los *template/primers* de DNA polimerasas α fueron Poly(dA)/oligo(dT) y para la β se usaron dos: Poly(dA)/oligo(dT) y Poly(rA)/oligo(dT).

¹² Varios científicos de Merck Sharp and Dohme Research (*Oogose et al* 1987 y *Goldman et al.*, 1990) estudiaron la interacción competitiva de quinonas en el *template/primer* de la enzima, asumiendo que la reducción de los grupos quinónicos afecta a la especificidad.

Las IC₅₀ de la quinoxapeptina A frente a tres cepas virales mutantes en la región RT (mutantes simples Y181C y K103N y doble mutante Y181C/K103N) fueron 12 nM, 8 nM y 6 nM frente a esas tres variantes enzimáticas, lo que indica que el mecanismo de inhibición es diferente a los inhibidores no nucleósidos.

La especificidad fue comparada con la inhibición de varias DNA poli-isomerasas de mamífero (α , β , γ y δ), donde las IC₅₀ fueron muy altas (de 500 a 2500nM) en la quinoxapeptinas, lo que demostró la gran especificidad de éstas frente a las HIV-RT. El efecto de clara reversibilidad fue demostrado por la recuperación de la actividad tras diálisis de la mezcla de incubación por filtración en gel (Sephadex G-25).

1.3.5.- Mecanismos de acción

La gran característica a nivel molecular de la actuación de los antibióticos quinoxalínicos y quináldicos es su efecto de bis-intercalación entre la doble hélice de DNA. La posible unión equinomicina-doble cadena de DNA ya se estudió por Ward y colaboradores (1965), cuando observó cambios en el espectro de absorción al añadir DNA a una solución del compuesto, sin que se observaran cambios significativos si se añadía DNA de cadena simple o DNA desnaturalizado. Waring y Wakelin (1974) comprobaron que no existió ningún cambio de absorción con polirribonucleótidos. Waring y Makoff (1974), investigaron la inhibición de la síntesis de RNA en sistemas vivos (cultivo de *Bacillus megaterium*) provocada por equinomicina y triostinas, donde superaban a la detectada por la actinomicina D.

El efecto de intercalación fue intuido por Hale y sus colaboradores en 1972 sobre el plásmido PM2 DNA, donde, a baja fuerza iónica ($I=0.01$ o 0.036), se producía un ángulo de desenrollamiento dos veces mayor (desenrollamiento y elongación) que cuando se añadía bromuro de etidio. Sin embargo, los cambios en la viscosidad de fragmentos de DNA sonificados fue casi el doble de lo esperado de un simple proceso de monointercalación.

El patrón de unión de equinomicina a polinucleótidos fue estudiado por Wakeling y Waling en 1976, al deducir que éste compuesto presentaba alta afinidad por polímeros ricos en G y C¹³. La constante de unión decreció en el siguiente orden: poly(dG)-poly(dC) > poly(dG-dC) > poly(dA-dT). Apenas existió unión a poly(dA)-poly(dT) ni a poly(dI)-poly(dC). Van Dyke y Dervan (1984) realizaron el DNA-*footprinting*, donde concluyeron que la equinomicina requería un sitio de unión de cuatro pares de bases. Los mejores sitios de unión presentaban el par de bases central 5'-CG-3'.

Por otra parte, se demostró (Huang et al., 1983) que la equinomicina no podía producir uniones tipo II entre dos moléculas de DNA.

Para conocer que parte de la molécula interaccionaba con el DNA, Wakeling y Waring (1976), comprobaron la nula interacción de los residuos cromóforos solos (ácido quinoxalínicos) sobre el plásmido circular-cerrado PM2 DNA. En 1978, el equipo de

¹³ La unión de equinomicina y triostina A a DNA de *Micrococcus lysodeikticus* (72% G+C) fue 10 veces mayor que frente a DNA de *Clostridium perfringens* (30% G+C)

Constantino y col. analizaron los espectros cristalinos de complejos DNA-equinomicina, comprobándose que los grupos cromóforos presentaban cierta rotación respecto a la estructura peptídica. Se clarificaron los mecanismos de unión, tanto de equinomicina como de triostina A por el análisis de cristales, se dedujo que además de intercalación, existen puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals entre el esqueleto peptídico y las bases nitrogenadas (Wang *et al.*, 1984). La distribución de las señales de intensidad de difracción fue la misma en triostina A-DNA que equinomicina-DNA, lo que indicaba que a pesar de que los cristales formados por equinomicina-DNA eran más amorfos, el mecanismo de unión era el mismo en los dos compuestos.

La especificidad de reconocimiento de los grupos cromóforos y los aminoácidos sobre ácidos nucleicos ha sido investigada por tres técnicas: estudios de espectro de absorbancias y fluorescencia DNA-compuestos (Waring, 1979, Cornish *et al.*, 1983¹⁴), análisis huella genética (Goodisman y Dabrowiak, 1985, 1991; Boger *et al.*, 1996), y estudios de RMN (Leroy *et al.*, 1992, Gilbert y Feigon, 1992¹⁵, Chen y Patel, 1995). Todavía no está perfectamente aclarada dicha especificidad (Waring, 1993) debido a multitud de factores, fundamentalmente por la heterogeneidad de la conformación espacial¹⁶. Para determinar las preferencias de reconocimiento hay que tener en cuenta multitud de parámetros, como la fuerza iónica del medio, propiedades termodinámicas del complejo DNA-droga, el grado de enrollamiento del DNA, la naturaleza química de los grupos intercalantes, la funcionalidad de radicales, etc. Un claro ejemplo de todo ello (Lee y Waring, 1978) fueron que las preferencias del TANDEM¹⁷ ya no eran hacia poly(dG-dC) como en triostina A, sino que eran de poly(dA-dT), lo que derivaba en la importancia de las fuerzas de cohesión intramolecular: puentes de hidrógeno entre restos -NH de valinas y CO de alaninas, desplazarían las antiguas uniones (triostina A) provocadas por puentes de hidrógeno de guaninas, y ahora mostraban preferencias por bases A.T (Waring, 1987; Waring, 1990). Las preferencias encontradas con dos quinolín-derivados: sandramicina y luzopeptina A (Boger *et al.*, 1996) fueron hacia 5'-CAT, y por estudios de unión al oligo 5'-d(GCATGC)₂ determinaron que la distancia intercromóforos era de 10.1 Å, teniendo, en condiciones de saturación, una proporción de 1:6.7 droga/par de bases, frente a 1:4.5 de la luzopeptina A.

El equipo de trabajo de Quigley publicó en 1986 la cocrystalización completa de triostina A con d(GCGTACGC), donde cuatro pares de bases son tipo Watson-Crick y los otros cuatro tipo Hoogsteen (incluidos dos A.T y dos G.C). Por su parte, Mendel y Dervan (1987) describieron la unión selectiva de los grupos cromóforos quinoxalínicos entre A₁ y C₂ de d(ACGT)₂ y entre T₁ y A₄ de d(TCGA)₂, afirmando que los pares de bases GC en ambos complejos y los pares T₁-A₄ de d(TCGA)₂ presentan enfrentamientos tipo Watson-Crick, mientras que T₄-A₁ eran pareamientos tipo Hoogsteen. La unión de todos los compuestos se realiza en el surco pequeño (*minor groove*) del DNA. Recientemente,

¹⁴ Es sorprendente el hecho de que bis-quinolín-triostin A no sea fluorescente, mientras que sí lo es bis-quinolín-equinomicina.

¹⁵ Se definieron interacciones de dos moléculas de quinomicinas con el decámero [d(ACGTATACGT)]₂

¹⁶ Dependiendo de la fuerza iónica y la naturaleza del solvente, existen cambios conformacionales, lo que se traduce por multitud de interpretaciones en los ángulos de rotación de los grupos cromóforos, que alteran la naturaleza de la unión con el DNA (Waring *et al.* 1990, Waring *et al.*, 1991).

¹⁷ Depsipeptido sintético que difiere de triostina A en la falta de grupos metilos de N-metil-cisteína y L-N-metil-valina, formándose cisteína y valina.

(Park y Choi, 1995) se ha demostrado por estudios de RMN en la unión equinomicina- $d(ACGTTAACGT)_2$ que los pares de bases terminales A.T eran tipo Hoogsteen, mientras que los cuatro centrales AT eran tipo Watson-Crick. Sin embargo, las uniones al DNA $d(ACACGTGT)$ del compuesto quinolínico UK-63,052, sólo se realiza a través de sistemas de apareamiento tipo Watson-Crick (Chen y Patel, 1995)

1.4.- TIOCORALINA A

La tiocoralina A es un compuesto aislado de *Micromonospora* sp. ACM2 por personal de PharmaMar, patentado en 1994 y cuya estructura quedó reflejada en la Figura 1.10. Dicho compuesto presenta una serie de características que lo hacen, a priori, un buen candidato a su desarrollo en ensayos clínicos como agente antitumoral.

Al ser un producto microbiano, las posibilidades de incremento y control de producción, obtención de derivados que reúnan mejores características de toxicidad, solubilidad o estabilidad, entran dentro de proyectos a medio plazo. La ventajosa rentabilidad de obtención, en comparación con productos análogos de síntesis química, o procedentes de organismos superiores es indiscutible.

La efectividad de su acción está siendo investigada en estos momentos. Los datos aportados por Faircloth (comunicación personal, Marzo 1998) referente a estudios preclínicos de tiocoralina A, especifican una MTD entre 400 y 200 $\mu\text{g/Kg}$, siendo fundamental la elección del vehículo apropiado, debido a la escasa solubilidad que presentan estos compuestos. La fuerte selectividad inicial detectada frente a melanoma de ratón B16 y carcinoma humano MX-1 mamario hacen de dicho producto un prometedor candidato a ensayos clínicos. Además, los datos que están siendo aportados por García-Grávalos (comunicación personal, mayo 1998) sobre los ensayos clonogénicos a partir de cultivos procedentes de biopsias humanas, describen unas tasas de inhibición de los cultivos tumorales que superan el 50% a dosis inferiores a 0.01 μM , sobre tumores refractarios tipo carcinoma de páncreas y ovario.

El estudio de su mecanismo de acción está siendo llevado a cabo en el Instituto Mario Negri de Milán. Se ha observado, por estudios de citometría de flujo, un bloqueo en la fase G1 y un descenso en la velocidad de la evolución de la fase S hacia G2M en el ciclo celular de células LoVo, aunque su efecto es reversible (citostático) después del lavado (Bergamaschi et al., 1996). Los últimos informes, no publicados, la califican como buen agente frente a poblaciones celulares resistentes a doxorubicina, tal vez por ser buen sustrato de Pgp. El mecanismo de acción no está claro, parece que inhibe principalmente la síntesis de RNA (García de Quesada, comunicación personal), hecho común a los componentes quinoxalínicos.

Con estas premisas, se ha desarrollado esta tesis para avanzar en el conocimiento de la productividad de dos cepas emparentadas, productoras de tiocoralinas y su comparación con cepas productoras de triostinas y sandramicina; elucidación estructural y medida de actividad de tres compuestos muy similares a tiocoralina A. Por último, se abordará la experimentación de unión a DNA para comprobar los efectos de la posible bis.-intercalación.

2.- OBJETIVOS

Los principales objetivos de esta tesis pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Detección de posibles características taxonómicas comunes, especialmente en cuanto a resistencia a antibióticos, de cuatro cepas productoras de compuestos de la familia de equinomicinas.
2. Estudio de los efectos sobre crecimiento y producción de tiocoralinas, sandramicinas y triostinas de cada una de las variables seleccionadas (nutrientes), empleando la técnica de Plackett y Burman.
3. A partir de datos obtenidos en el punto anterior, se pretendió diseñar el medio optimizado empleando dos técnicas de respuestas de superficies sobre las dos cepas microbianas productoras de tiocoralinas. Por medio de métodos matemáticos complejos para el estudio de la interrelación entre las variables.
4. Valoración del efecto sobre productividad de tiocoralinas por la suplementación con aminoácidos y grupos cromóforos análogos al ácido 3-hidroxiquinolín-2-carboxílico (integrante de la estructura del compuesto) con ambas cepas productoras.
5. Aislamiento y elucidación estructural de nuevas tiocoralinas (sólo era conocida la tiocoralina A (TA)), ya que se sospechó la existencia de otros compuestos relacionados por su absorbancia a UV₃₆₀ unido a actividad antimicrobiana y antitumoral.
6. Detección de la posible relación estructura/actividad de las nuevas tiocoralinas: TB, TC y TE a la vez que se conoció el espectro antimicrobiano y antitumoral de todas ellas.
7. Comprobación del posible efecto de bis-intercalación en el DNA de las tiocoralinas, descrito ampliamente como característica de los compuestos quinoxalínicos y derivados, por alteraciones de la movilidad electroforética del plásmido pBR322.
8. Estudios sobre la posible inhibición de la topoisomerasa II de la tiocoralina A y echinomicina
9. Detección de las principales diferencias de mecanismo de acción entre equinomicina y tiocoralina A

3.- MATERIALES

3.1.- MICROORGANISMOS

3.1.1.- Cepas aisladas por Pharma Mar, S.A. productoras de tiocoralinas

- **ML1** (L-25-ML1-005): Es un Actinomiceto perteneciente a la familia *Micromonosporaceae* (*Micromonospora* sp. ML1). Fue aislado por personal de Pharma Mar a partir de un molusco sin determinación taxonómica precisa, en aguas del Océano Índico, cerca de la costa de Mozambique en Agosto 1992.
- **ACM2** (L-13-ACM2-092): Es un Actinomiceto perteneciente a la familia *Micromonosporaceae* (*Micromonospora marina* ACM2). Depositada como CECT 3326. Los criterios taxonómicos han quedado perfectamente definidos en la patente de Pharma Mar USSN 08/224/628 de 1994. Esta cepa fue aislada por personal de Pharma Mar a partir de un antozoo sin determinación taxonómica concreta, encontrado en aguas del Océano Índico, cerca de las costas de Mozambique en Noviembre 1989.

3.1.2.- Microorganismos de colección utilizados

Actinomicetos productores de compuestos quinoxalínicos y quinolínicos utilizados para estudios comparativos de taxonomía y mejora de medios

- *Nocardioides* sp. (ATCC 39419): Actinomiceto perteneciente al género *Nocardioides*. Es el productor de sandramicina (*Matson et al.*, 1989)
- *Streptomyces triostinicus* (ATCC 21043): Junto con *Streptomyces aureus* (*Shōji*, 1961), son los productores de triostinas (*Kuroya et al.*, 1961).

Bacterias utilizadas para la realización de ensayos antimicrobianos

- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633): Bacilo esporulado Gram positivo
- *Escherichia coli* (ATCC 10536): Enterobacteria Gram negativo
- *Micrococcus luteus* (ATCC 9341): Gram positivo
- *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* (ATCC 6538-P): Gram positivo
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027): Gram negativo

3.2.- LINEAS CELULARES TUMORALES

P388 (ATCC CCL 46). Línea original aislada de un neoplasma linfoide inducido en ratón DBA/2. Utilizada en este trabajo en la determinación de IC₅₀

A549 (ATCC CCL 185): Línea celular inducida por implantación en ratón de un cultivo de tejido de adenocarcinoma de pulmón humano

HT29 (ATCC HTB 38): Línea celular aislada mediante explantación de tejido de un adenocarcinoma de colon humano en grado II

SK-MEL28 (ATCC HTB 72): Línea derivada de melanoma humano

3.3.- REACTIVOS, MATERIAS PRIMAS, SUSTRATOS Y ENZIMAS

Los reactivos empleados en la realización del presente trabajo, excepto los reactivos de extracción y los componentes de medios de cultivo, fueron de calidad analítica si no se especifica lo contrario.

- Nutrientes: glucosa, peptona, triptona, extracto de malta, etc., fueron suministrados por Difco; el almidón soluble fue suministrado por Merck; la levadura cervecera C₁₅ fue suministrado por Julia Parera.
- Medios deshidratados: Nutrient Broth Agar, Brain Heart Infusion, McMüller-Hilton, etc., fueron de Difco.
- Agar: fue adquirido a Difco.
- Los aminoácidos y grupos cromóforos análogos fueron suministrados por Aldrich.
- Las sales marinas se adquirieron a Instant Ocean®.
- Los paneles de antibiogramas, consumo de fuentes de carbono y reacciones bioquímicas fueron provienen de Difco y fueron donados por el Instituto de Inmunología y Alergia.
- Las tiras de consumo de azúcares fueron adquiridas a Microkit Ibérica.
- El agua destilada fue obtenida por ósmosis inversa con un equipo Milli-Q (Millipore)
- Los disolventes empleados en extracción (acetato de etilo y hexano) fueron de calidad para síntesis, mientras que los empleados en purificación y espectro de solubilidad fueron calidad para análisis (acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, metanol, hexano, isopropanol, acetona, DMSO, etc) y fueron adquiridos a SDS.

Reactivos de biología molecular

- En Sigma se adquirieron el Tris base, EDTA- Na_2 , BSA, ATP, proteinasa K, glicerol, azul de bromofenol, bromuro de etidio y agarosa.
- De Merck se utilizaron el Tris base, HCl, NaCl, KCl, MgCl_2 , β -mercaptoetanol y ácido acético.
- El plásmido pBR322 (de *E.coli*, 4363 pares de bases) se adquirió a Gibco.
- La topoisomerasa II (humana) se adquirió a TopoGen. La topoisomerasa II (*Drosophila melanogaster*) fue suministrada por USB.

3.4.- MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Medio básico MB: Es una modificación del medio ISP-2 (*International Streptomyces Project*)

Dextrosa	4 g/l
Extracto de levadura	4 g/l
Extracto de malta	10 g/l
CaCO_3	4 g/l
Sales marinas	10 g/l

Utilizado para el crecimiento de las cepas a estudiar en las comparaciones taxonómicas y como medio base en los estudios de adiciones de aminoácidos y grupos cromóforos análogos.

Medio sólido 172B: Derivado del medio ATCC 172

Glucosa	10 g/l
Almidón soluble	20 g/l
Extracto levadura	5 g/l
N-Z amina tipo A	5 g/l
Sales marinas	10 g/l
CaCO_3	1 g/l
Agar	15 g/l

Ajustar el pH a 6.8 antes de añadir el CaCO_3

Utilizado para la obtención de crecimiento vegetativo de las cuatro cepas en estudio, tanto para la crioconservación como para el primer estadio de la fermentación primaria.

Nutrient Agar

Medio recomendado por *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, utilizado para la mayoría de microorganismos menos fastidiosos.

Extracto de carne	3 g/l
Peptona	5 g/l
Agar	15 g/l

Ajustar el pH a 6.8

Medio sólido utilizado para los controles de esterilidad.

Medio Inóculo de Actinomicetos Marinos (MIAM): Diseñado por Pharma Mar

Extracto de carne	3 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Triptona	5 g/l
Glucosa	5 g/l
Almidón soluble	20 g/l
Sales marinas	10 g/l
CaCO ₃	4 g/l

Ajustar el pH a 6.8 con OHNa antes de añadir el CaCO₃

Este medio se ha utilizado en la preparación de los inóculos.

Müller-Hinton

Infusión de carne	300 g/l
Casaminoácidos	17.5 g/l
Almidón	1.5 g/l

Ajustar el pH a 7.4

Utilizado para el crecimiento de las bacterias empleadas en antibiogramas sobre medio líquido.

Brain Heart Infusion (BHI) con 1.5% agar

Recomendado para el crecimiento de todo tipo de microorganismos, incluidos los fastidiosos tales como los patógenos dentales. Fue recomendado para la elaboración de ensayos antibacterianos en medio sólido por su riqueza nutricional y transparencia.

Infusión de cerebro de ternera	200 g/l
Infusión de corazón vacuno	250 g/l
Peptona proteosa	10 g/l
Dextrosa	2 g/l
NaCl	5 g/l
Na ₂ HPO ₄	2.5 g/l

Ajustar el pH a 7.4

Se ha utilizado para el crecimiento de bacterias en antibiogramas en medio sólido

4.- MÉTODOS

Métodos microbiológicos

4.1.- MÉTODOS TAXONÓMICOS COMPARATIVOS

Para la realización de esta tesis se investigaron las posibles diferencias existentes en cuanto a utilización de diversas fuentes de carbono, tolerancia al crecimiento en presencia de diversas concentraciones de sales y sensibilidad a antibióticos.

4.1.1.- Utilización de fuentes de carbono

Se utilizaron tres métodos para conocer el consumo de determinadas fuentes de carbono por las cuatro cepas sometidas a estudio.

Toda la experimentación se realizó por duplicado.

Sistema PASCO® de Difco Laboratories

Método basado en el empleo de paneles comerciales conteniendo pocillos sobre los que se han fijado sustratos que al ser utilizados producen virajes colorimétricos por la formación de ácidos, productos del metabolismo bacteriano. Empleando azul de bromotimol como indicador, que cambia su color de verde a amarillo, se mide el descenso de pH fotométricamente.

El sistema de inoculación está diseñado para la preparación de un inóculo estandarizado para uso en sistemas de pruebas de microdilución.

La metodología seguida fue la siguiente:

- Cada cepa se hizo crecer sobre el medio básico MB durante 48 h, en matraz Erlenmeyer de 100 ml, conteniendo 25 ml de dicho medio e incubando a 28°C con agitación de 220 rpm.
- Transcurrido dicho tiempo y tras comprobar la pureza del cultivo al microscopio, se inocularon 250 µl sobre un vial que contenía 25 ml de polisorbato 80 al 0.02%.
- Se vertió el contenido de dicho vial sobre los canales del panel que contenían los sustratos adecuados.
- Como control se empleó un blanco (sin sustrato).
- Los paneles se incubaron en estufa a 30°C durante 48 h.
- La lectura de los paneles se realizó por detección fotométrica del viraje del color.
- Los azúcares utilizados con éste método fueron: arabinosa, celobiosa, lactosa, manitol, ribosa y sacarosa.

Utilización de tiras BIOSTRIP® de Microkit

Este sistema está basado en la detección del viraje colorimétrico por bajada de pH al consumirse el sustrato que viene embebido en tiras de celulosa estériles. El medio empleado, solución salina peptonada al 0.5%, aporta la fuente nitrogenada necesaria pero no la fuente carbohidratada, confirmando por controles sin tira la no existencia de crecimiento en ninguna de las cuatro cepas probadas.

La metodología empleada fue la siguiente:

- Sobre tubos de 15 cm de longitud y 16 mm de diámetro, se dispensaron 4.75 ml de solución salina (0.9%) peptonada al 0.5%, cerrándolos con tapón de algodón graso y esterilizándolos durante 20 min. en autoclave a 121°C.
- Una vez a temperatura ambiente, se introdujo en condiciones estériles, una tira de Biostrip® y se inocularon, a razón de 250 µl/tubo, con un inóculo desarrollado tal y como se describe en el apartado 4.2.1.2
- Se incubaron en armario agitador a 28°C, a 220 rpm durante 72 h.
- Se valoró como consumo positivo (+) el viraje del color, así como el crecimiento por observación directa al microscopio.

Con este sistema se probaron: adonitol, arabinosa, celobiosa, dulcitol, fructosa, glucosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol, rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa, sorbitol, trehalosa y xilosa.

Adición directa de azúcares

Se determinó el crecimiento celular por la aparición de turbidez en el medio salino peptonado suplementado con diferentes fuentes de carbono a una concentración final de 10 mg/ml.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- Sobre tubos de las medidas anteriormente descritas, conteniendo 3.75 ml de solución salina peptonada al 0.5%, se añadieron asépticamente 50 mg de cada azúcar disuelto en 1 ml de agua y esterilizado a través de filtro con tamaño de poro de 0.22 µm.
- Se inoculó cada tubo con 250 µl del cultivo en fase exponencial de crecimiento.
- Se incubaron a 28°C y agitación a 220 rpm durante 72 h.
- Se observó el viraje del color, así como el crecimiento por observación directa al microscopio.

Las fuentes de carbono empleadas fueron: arabinosa, fructosa, glucosa, maltosa, manitol, sacarosa, sorbitol y xilosa.

4.1.2.- Reacciones bioquímicas

Se utilizó el sistema PASCO® anteriormente descrito, pero modificado para la determinación de las siguientes pruebas:

Consumo de urea: la hidrólisis de la urea por la enzima ureasa dió lugar a la formación de amonio. El consiguiente incremento de pH se midió utilizando rojo fenol como indicador, que vira de amarillo a rosa.

Consumo de arginina: el catabolismo anaerobio de arginina originó la formación de una amina básica que fue detectada con la ayuda del indicador púrpura de bromocresol. La reacción dió como resultado un color morado.

Consumo de esculina: la utilización de esculina dió lugar a la formación de ácidos. La consiguiente disminución de pH fue detectada empleando el indicador de púrpura de bromocresol que vira de verde a amarillo.

Producción de fosfatasa: la producción de fosfatasa se detectó en base a la unión específica de p-nitrofenil-fosfato, que dió coloración amarilla.

Producción de α -glucosidasa: el p-nitrofenol producido dió lugar a la aparición de una coloración amarilla.

Producción de β -glucuronidasa: se desarrolló un color amarillo por el p-nitrofenol producido en la reacción.

Reacción de Voges-Proskauer: la acetofina producida por el piruvato sódico, se combinó con creatina y α -naftol a un pH alcalino originando un color entre rosa y rojo.

Hidrólisis de Pyr: la hidrólisis de p-dimetilamino-cinamaldehído (Pyr) liberó ácido L-piroglutámico y β -naftilamina, formándose una base rojiza cuando la β -naftilamina reaccionó con el reactivo de Pyr.

Resistencia a cloruro sódico: la tolerancia específica a NaCl, considerando como (+) el mismo crecimiento que el pocillo control, (-/+) a crecimiento dudoso o debilitado y (-) a la ausencia de turbidez.

Presencia de catalasa: la catalasa descompuso el peróxido de hidrógeno formándose agua y oxígeno. La aparición de éste último se visualizó directamente por la aparición de burbujas.

4.1.3.- Sensibilidad a antibióticos

4.1.3.1.- Antibióticos comerciales

Esta valoración se determinó utilizando el mismo sistema PASCO® anteriormente descrito. Los pocillos de antibiótico contenían diferentes concentraciones de los mismos. La valoración de resistentes (R), inhibidores (I) y sensibles (S) se fundamenta en criterios de BP (*Break Points*) determinados por la NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

4.1.3.2.- Tiocoralina A

El método empleado para valorar la sensibilidad a tiocoralina A, tanto para las cepas que la producen como para las productoras de otros antibióticos quinoxalínicos fue el siguiente:

- Se preparó una solución concentrada de tiocoralina A (TA) solubilizada en diclorometano (CH_2Cl_2), se esterilizó por filtración y se distribuyó en tubos estériles para alcanzar concentraciones finales de 0.5, 1, 5 y 10 mg TA/ml. Posteriormente se dejó evaporar el disolvente en cabina de flujo laminar durante 48 h. Para el control se evaporó 1 ml de CH_2Cl_2 .
- A cada tubo se añadieron 4.75 ml de medio básico MB, sonicándolo fuertemente hasta conseguir una emulsión homogénea, ya que la TA es insoluble en medio acuoso.
- Posteriormente, se inocularon 0.25 ml por tubo de la cepa correspondiente, dejando los tubos incubar en agitador a 220 rpm y 28°C durante 96 h.
- Transcurrido dicho tiempo, se extendieron 100 μl de cada tubo sobre placas MB conteniendo agar al 1.5% y se incubaron a 28°C durante 7 días.

Cada muestra se realizó por duplicado.

Se consideró MIC a aquella concentración de TA que produjo inhibición de crecimiento en placa y como efecto bacteriostático al que, no observándose crecimiento en tubo, sí se recuperó en placa.

4.1.4.- Tolerancia a la salinidad

Las sales empleadas, comercializadas con el nombre de Instant Ocean® contiene los mismos componentes que la composición promedio del agua marina.

El método empleado fue el siguiente:

- En cada uno de 5 tubos se dispensaron diferentes cantidades de sal calculando que su concentración final, para 5 ml, fuese de 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%.
- Posteriormente se añadieron 4.75 ml de medio MB (sin sales) por tubo, sonicándolos para solubilizar las sales.
- Se esterilizaron en autoclave durante 20 min. a 120°C.
- Previamente a la inoculación, y todavía calientes, fueron sonicados durante otros 10 min.
- Se inocularon con el microorganismo y los tubos se incubaron a 28°C a 220 rpm durante 96 h.
- Transcurrido dicho tiempo, se inocularon placas de Petri con 100 μl de la mezcla de incubación para observar el efecto bactericida o bacteriostático de las sustancias ensayadas.
- Posteriormente, la mezcla de incubación remanente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. para medir el volumen micelial según se describe en 4.2.3.

Cada muestra se realizó por duplicado.

4.2.- FERMENTACIONES

4.2.1.- Fermentación primaria

4.2.1.1.- Mantenimiento y conservación de cepas

- Las cepas objeto de estudio: *Micromonospora marina* ML1 y ACM2 (productoras de tiocoralinas), *Nocardioides sp.* ATCC 39419 (productora de sandramicina) y *Streptomyces triostinicus* ATCC 21043 (productora de triostinas). Fueron conservadas a -65°C en medio sólido 172B con una solución estéril de glicerol 20% y sacarosa al 5%.
- Para ello, se hicieron crecer sobre medio líquido de inóculo MIAM-1 a 28°C y agitación a 220 rpm, hasta el final de la fase exponencial de crecimiento. Este tiempo suele estar comprendido entre 48 y 72 h.
- Posteriormente, se extendieron 200 µl del cultivo sobre una placa de 10 cm de diámetro conteniendo medio sólido 172 B (*Espliego*, 1997).
- Después de 7 días de incubación a 28°C en estufa, con la ayuda de un “sacabocados” estéril, se extrajeron 5 cilindros de 1 cm³ del césped, guardándolos en crioviales. A cada vial se le añadieron como agente crioprotector alicuotas de 300 µl de glicerol/sacarosa.
- Estos crioviales fueron conservados a -65°C, manteniéndose las cepas viables al menos por 2 años.
- Paralelamente, se realizaron controles de esterilidad mediante crecimiento en agar nutritivo sólido.

4.2.1.2.- Desarrollo de inóculos

El proceso seguido fue el siguiente:

- Inoculación de matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de inóculo MIAM-1 (*Espliego*, 1997) con cilindros del microorganismo provenientes de un criovial congelado tal y como se describe en el apartado anterior. Los matraces se incubaron a 28°C y con agitación a 220 rpm durante 72 h¹.
- Posteriormente se procedió a inocular matraces Erlenmeyer de 2000 ml de capacidad con 250 ml del mismo medio con 25 ml de las bacterias crecidas, incubando a 28°C y con agitación a 220 rpm durante 48 h. Una vez finalizada esta incubación, se utilizaron dichos matraces para inocular los matraces conteniendo el medio de producción.

¹ Debe observarse la aparición de coloración anaranjada en ambos casos a partir de 48 h.

4.2.2.- Fermentación de producción²

4.2.2.1.- Mejora de medios

A partir del medio de fermentación estándar desarrollado por Pharma Mar, donde se detectó actividad en ambas cepas productoras de tiocoralinas, se estudió la influencia de variación de cada nutriente sobre el crecimiento y productividad con el fin de elegir aquellos nutrientes que fueran más significativos a la hora de seleccionar la composición de medios según la técnica de Plackett y Burman. Para ello, se diseñaron 16 medios de cultivo cuya composición es la que se muestra en la tabla 4.1.

Tabla 4.1.- Matriz empleada para comparación de crecimiento y producción de las cuatro cepas en estudio

	Glucosa	Almidón	Levadura	Malta	Peptona	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃
1	30	40	10	10	1	1	0.5
2	30	40	10	1	10	0.1	5
3	30	40	1	10	1	1	5
4	30	4	10	1	10	1	0.5
5	3	40	1	10	10	0.1	0.5
6	30	4	10	10	1	0.1	5
7	3	40	10	1	1	1	0.5
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5
9	30	4	1	10	1	0.1	0.5
10	3	4	10	1	1	0.1	5
11	3	40	1	1	1	1	5
12	30	4	1	1	10	1	5
13	3	4	1	10	10	1	5
14	3	4	10	10	10	1	0.5
15	3	40	10	10	10	0.1	5
16	3	4	1	1	1	0.1	0.5

Todos los valores están expresados en g/l

Los matraces Erlenmeyer fueron de 250 ml conteniendo 50 ml de medio.

La preparación de estos medios y las condiciones de fermentación fueron las siguientes:

- Los nutrientes más solubles (glucosa, extracto de malta, peptona, HK₂PO₄ y sales) fueron disueltos en agua destilada y añadidos a los matraces como solución acuosa (0.1 g/l de HK₂PO₄ equivale a añadir 5 mg/matraz). Los demás nutrientes fueron pesados en balanza semianalítica y se añadieron como polvo seco.
- Las soluciones de glucosa y HK₂PO₄ fueron preparadas aparte y añadidas después de esterilizar.
- Una vez inoculados, los diferentes matraces fueron incubados con agitación a 250 rpm y a 28°C durante 6 días.
- Los muestreos se efectuaron a las 96 y 144 h desde su inoculación para valoración de crecimiento, y a 144 h para la valoración de la actividad biológica.

Cada medio se preparó por duplicado.

² Con el concepto fermentación de producción se califica la última fase de crecimiento de la que se extraerán las valoraciones biológicas o químicas encaminadas a la cuantificación del/los producto/s antitumoral/es activo/s.

Para el estudio de los efectos de cada variable sobre el crecimiento y la producción, se realizaron dos series completas para cada una de las dos cepas productoras de tiocoralinas y una serie por cada cepa productora de triostinas y sandramicina.

La preparación de medios para optimización fue la misma a la descrita anteriormente.

4.2.2.2.- Efecto de adiciones exógenas

La metodología empleada se describe a continuación:

- Se prepararon matraces de 2 l con 250 ml del medio base MB y se esterilizaron a 120°C durante 20 min. en autoclave.
 - Una vez alcanzada la temperatura ambiente, fueron inoculados a razón del 5% v/v, y se incubaron a 28°C agitando a 220 rpm.
 - Los diferentes compuestos estudiados se añadieron a los matraces en condiciones estériles 48 h después de la inoculación.
 - Se volvieron a incubar a 28°C y 220 rpm hasta la toma de muestra.
 - El procesamiento de las muestras se realizó siguiendo el esquema descrito en 4.6.
- Cada serie llevó un control de referencia.

4.2.2.2.1.- Adición de grupos cromóforos análogos

Los diferentes análogos de los grupos cromóforos estudiados fueron: ácido 4-hidroxiquinolín-2-carboxílico, ácido 3-hidroxi-2-quinoxalíncarboxílico, ácido 4-metoxi-2-quinolíncarboxílico, ácido 7-metoxi-2-benzofuráncarboxílico, ácido 4,8-dihidroxiquinolín-2-carboxílico, ácido cromón-2-carboxílico y ácido cumarín-3-carboxílico. Estos compuestos fueron añadidos directamente y en condiciones estériles a los cultivos bacterianos.

Se estudió el efecto de las adiciones en dos bloques:

1. Adiciones de siete análogos comerciales de los grupos cromóforos de la estructura de las tiocoralinas sobre la cepa ML1 a 48 h de su inoculación, como compuestos sólidos para llegar a una concentración final de 2.5 mM. Se muestreó a las 144 h.
2. Adiciones de los dos análogos más destacados, derivados comerciales de los grupos cromóforos de tiocoralinas y equinomicinas, a 48 h de su inoculación, a tres concentraciones diferentes y muestreando a diferentes horas.

En la primera experimentación, los compuestos fueron añadidos a los matraces al cabo de 48 h de cultivo con espátula estéril y directamente del vial de envío. La cantidad de compuesto fue calculada por diferencias de pesada del vial de origen.

En la segunda, al ser los compuestos insolubles en agua, se prepararon suspensiones de los mismos en agua destilada, se esterilizaron a 120°C durante 15 min. en autoclave, y

fueron dispensados directamente en los matraces, procurando mantener la homogeneidad de las emulsiones. En los matraces control, se añadieron 15 ml de agua destilada estéril.

Las tomas de muestras se realizaron a las 144 h como toma única en el primer *screening*, y a las 72, 96, 144 y 192 h en el segundo apartado.

4.2.2.2.2.- Adición de aminoácidos

- Como en el caso anterior, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 2 l con 250 ml de MB.
- Se seleccionaron L-cisteína, L-triptófano, L-glicina y L-tirosina.
- Las concentraciones finales de estos aminoácidos en los caldos fueron de 0.25 mM, 2 mM y 5 mM.
- Los aminoácidos hidrosolubles, L-glicina y L-cisteína fueron añadidos disueltos en agua tras filtración. Los aminoácidos insolubles, L-tirosina y L-triptófano fueron añadidos directamente, previa esterilización a 120°C durante 15 min.
- Todos los aminoácidos se añadieron a las 48 h de la inoculación.
- Los muestreos para la detección de actividad se realizaron a las 72, 96, 144 y 192 h.

4.2.3.- Medida del crecimiento bacteriano

El crecimiento celular se midió por el volumen micelial empaquetado. Un volumen de 10 ml de caldo de fermentación se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. y se determinó el porcentaje del volumen total ocupado por el micelio.

4.2.4.- Influencia de los componentes del medio sobre el crecimiento y la producción

Se procedió al estudio de la repercusión que tuvo la selección de nutrientes, y la interacción entre ellos sobre el crecimiento y producción de compuestos activos producidos por las cuatro cepas sometidas a estudio.

4.2.4.1.- Método de Plackett y Burman

Este método (*Stowe et al.*, 1966; *Monaghan et al.*, 1989; *Greasham et al.*, 1989) está basado en la experimentación de N-1 variables independientes en N experimentos (matraces), con dos niveles (concentraciones de cada nutriente) por variable.

Para su realización, se seleccionaron siete variables con dos concentraciones cada una de ellas.

Tabla 4.2.- Variables y concentraciones utilizadas

Variable	Valor +	Valor -
Glucosa	30	3
Almidón soluble	40	4
Levadura C ₁₅	10	1
Ext. Malta	10	1
Peptona	10	1
HK ₂ PO ₄	1	0.1
Ca CO ₃	5	0.5

Todos los valores son expresados en g/l

Se elaboró la siguiente matriz³ para cada una de las cepas a estudiar:

Tabla 4.3.- Matriz empleada para comparación de crecimiento y actividad.

	Glucosa	Almidón	Levadura	Malta	Peptona	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃
1	+	+	+	+	-	+	-
2	+	+	+	-	+	-	+
3	+	+	-	+	-	+	+
4	+	-	+	-	+	+	-
5	-	+	-	+	+	-	-
6	+	-	+	+	-	-	+
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	-	-	+	-	-
9	+	-	-	+	-	-	-
10	-	-	+	-	-	-	+
11	-	+	-	-	-	+	+
12	+	-	-	-	+	+	+
13	-	-	-	+	+	+	+
14	-	-	+	+	+	+	-
15	-	+	+	+	+	-	+
16	-	-	-	-	-	-	-

El efecto de cada variable puede ser positivo, negativo o neutro, dependiendo del análisis matemático de la aplicación de las siguientes fórmulas sobre las respuestas, medidas como potencia de la actividad antitumoral (PAT) (ver 4.11.3).

Una vez obtenidos los PAT para cada medio de fermentación, se realizaron los siguientes cálculos:

- El efecto de cada variable (E_x) se calculó sobre la base de las diferencias entre los valores positivos y negativos de cada variable para cada cepa:

³ Cada fila de esta matriz representa un medio completo de fermentación y cada columna una variable (nutriente) a dos concentraciones (+ y -). Todas las variables comprobadas por éste método presentaron las siguientes características:

1. Cada una está representada a alto y bajo nivel en la mitad de los ensayos (8+, 8-).
2. La interacción entre dos variables cualquiera es tal que ambas están presentes en valores altos, bajos o alternados en un cuarto de los ensayos (4++, 4--, 4+- y 4-+).

$$E_x = \frac{PAT(+)}{N(+)} - \frac{PAT(-)}{N(-)}$$

$$N(+) = N(-) = 8$$

- El error experimental se calculó como el promedio de los cuadrados de los efectos “placebo” (E_d). Así se halló la varianza (V_{eff}) donde n es el número de variables “placebo”. Como norma general, se eligieron los tres valores de E_x más próximos al valor de 0:

$$V_{eff} = \frac{\sum (E_d)^2}{N}$$

$$N = n^{\circ} \text{ de variables placebo} = 3$$

- Error estándar (SE) es la raíz cuadrada de la varianza de cada efecto:

$$SE = \sqrt{V_{eff}}$$

- Nivel de confianza de cada variable se determinó mediante la t de Student:

$$t_x = \frac{E_x}{SE}$$

Para 3 grados de libertad

4.2.5.- Métodos de optimización de la producción por respuesta de superficies

4.2.5.1.- Optimización unidireccional dirigida (Método de Hendrix)

Mediante este sistema de mejora, se formularon una serie de medios de fermentación y se desecharon en cada paso los seis medios que presentaron menor actividad antitumoral, formulándose por cada medio desechado, otro nuevo medio de fermentación mediante la siguiente metodología:

1. Se calculó la media aritmética de cada variable
2. Al valor resultante se restó el valor correspondiente al medio a eliminar
3. El valor resultante se dividió por quince (número de ensayos por serie menos uno)
4. El valor resultante se multiplicó por dos
5. Al valor resultante se le restó el valor a eliminar
6. El resultante fue el valor que toma la variable en el nuevo medio de cultivo

Así, se realizaron éstas operaciones con cada una de las siete variables en los seis casos de reformulación, volviendo a fermentar los 16 ensayos (los 10 de mejor resultado con los seis nuevos), descartando otros seis al conocer los PAT, y así sucesivamente. Este método se utilizó con las dos cepas productoras de tiocoralina (ML1 y ACM2).

Sirva a modo de ejemplo las reformulaciones realizadas con la cepa ML1:

Primera matriz:

	Glucosa	Almidón	Levadura	Malta	Peptona	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.35
2	30	40	10	1	10	0.1	5	1.56
3	30	40	1	10	1	1	5	0.22
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.46
5	3	40	1	10	10	0.1	0.5	0.23
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.27
7	3	40	10	1	1	1	0.5	0.56
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.44
9	30	4	1	10	1	0.1	0.5	0.12
10	3	4	10	1	1	0.1	5	0.19
11	3	40	1	1	1	1	5	0.11
12	30	4	1	1	10	1	5	0.13
13	3	4	1	10	10	1	5	0.03
14	3	4	10	10	10	1	0.5	0.03
15	3	40	10	10	10	0.1	5	2.24
16	3	4	1	1	1	0.1	0.5	0.15
X ¹	16.5	22	5.5	5.5	5.5	0.55	2.75	0.0952

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable. ²: Media de los seis peores valores en sombra, muestras a reformular

Sustituir 9x17; 11x18; 12x19; 13x20; 14x21 y 16x22

Segunda matriz: (Primer descarte)

	Glucosa	Almidón	Levadura	Malta	Peptona	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.39
2	30	40	10	1	10	0.1	5	0.81
3	30	40	1	10	1	1	5	0.24
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.53
5	3	40	1	10	10	0.1	0.5	0.11
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.57
7	3	40	10	1	1	1	0.5	0.09
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.39
17	1.2	42.4	10.6	0.4	10.6	1.06	5.3	0.64
18	3	4	10	1	1	0.1	5	0.21
19	31.8	1.6	10.6	10.6	10.6	0.04	0.2	0.08
20	1.2	42.4	10.6	10.6	0.4	0.04	0.2	0.49
21	31.8	42.4	10.6	0.4	0.4	0.04	0.2	0.33
22	31.8	42.4	0.4	0.4	0.4	0.04	5.3	0.16
15	3	40	10	10	10	0.1	5	1.15
22	31.8	42.4	10.6	10.6	10.6	1.06	5.3	0.73
X ¹	20.1	31.6	7.9	5.5	5.5	0.43	2.75	0.148 ²

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable. ²: Media de los seis peores valores

4.2.5.2.- Diseño compuesto centralizado (Método de Box-Wilson)

Es un método basado en el estudio de los análisis de regresión obtenidos por el empleo de cuatro variables a cinco concentraciones diferentes (Strobel et al., 1993; Greasham et al., 1989). La elección de las variables y sus concentraciones vino determinada por el grado de significación de Plackett y Burman.

Tabla 4.4.- Variables empleadas para ML1 en la optimización por el método BWD

X_1 (Almidón)	X_2 (Peptona)	X_3 (Levadura)	X_4 (HK_2PO_4)	Codificación
1	1	1	0	-2
15	2	5	0.5mg	-1
30	3	10	5.0mg	0
45	4	15	50mg	+1
60	5	20	500mg	+2

Todos los medios fueron suplementados con 5 g/l de glucosa, 4 g/l de CaCO_3 y 10 g/l de sales marinas

Tabla 4.5.- Variables empleadas para ACM2 en la optimización por el método BWD

X_1 (Glucosa)	X_2 (Peptona)	X_3 (Levadura)	X_4 (CaCO_3)	Codificación
1	1	1	0	-2
15	2	5	2	-1
30	3	10	4	0
45	4	15	6	+1
60	5	20	8	+2

Todos los medios fueron suplementados con 5 g/l de almidón, 4 g/l de HK_2PO_4 y 10 g/l de sales marinas

Al ser este método un diseño fraccional, el número de ensayos para cada una de las cepas fue de 31, incluyendo 6 réplicas de los puntos centrales 0, 0, 0, 0, en vez de $5^4 = 625$ si se realizasen todas las combinaciones posibles.

El mapa o el contorno de puntos fue determinado por las relaciones entre la linealidad, interacción entre dos o tres variables independientes entre sí por los efectos cuadráticos de cada variable. Por ello, se fijó un punto central (0, 0, 0, 0) que representa fermentaciones con valores medios, (ver Tabla 4.6.), nos darán los valores de error estándar del método, así como el término independiente de la ecuación de predicción.

La matriz a emplear en cada uno de los dos casos fue la siguiente:

Tabla 4.6.- Matriz empleada en las optimizaciones por BWD

Ref.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0
31	0	0	0	0

El análisis de regresión múltiple para la producción, vino determinado por la ecuación de predicción siguiente:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + b_{123}x_1x_2x_3 + b_{124}x_1x_2x_4 + b_{234}x_2x_3x_4 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{44}x_4^2$$

Donde: y es la predicción de la producción; x_1 , x_2 , x_3 , y x_4 son las variables independientes (almidón, peptona, levadura y fosfatos para ML1 y glucosa, peptona, levadura y carbonato cálcico para ACM2); b_0 es el coeficiente de regresión en el punto central, b_1 , b_2 , b_3 y b_4 son los coeficientes lineales de cada variable, b_{12} , b_{13} , b_{14} , b_{23} , b_{24} y b_{34} son los coeficientes de interacción de segundo orden (binarios), b_{123} , b_{134} , b_{234} son los coeficientes de interacción ternarios y b_{11} , b_{22} , b_{33} y b_{44} son los coeficientes cuadráticos.

Una vez que se conocieron los resultados, se hallaron los coeficientes del modelo polinomial utilizando modelos de cálculo de regresión múltiple para cada una de las siguientes interrelaciones:

1.- Lineales, binarias y cuadráticas

$(x_1, x_2, x_3, x_4, x_1x_2, x_1x_3, x_1x_4, x_2x_3, x_2x_4, x_3x_4, x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_4^2)$

2.- Lineales, binarias, ternarias y cuadráticas

$(x_1, x_2, x_3, x_4, x_1x_2, x_1x_3, x_1x_4, x_2x_3, x_2x_4, x_3x_4, x_1x_2x_3, x_1x_2x_4, x_2x_3x_4, x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_4^2)$

3.- Lineales, ternarias y cuadráticas

$(x_1, x_2, x_3, x_4, x_1x_2x_3, x_1x_2x_4, x_2x_3x_4, x_1x_2x_3x_4, x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_4^2)$

Dependiendo el valor de Fisher ponderado (Fisher = Regresión/Desviación estándar) y dependiendo de los grados de libertad, se seleccionó aquella interrelación cuya predicción se asemejase más a los valores obtenidos.

Por el posterior tratamiento de datos, se pudieron conocer cómo afectaban las interrelaciones entre variables.

Métodos químicos

4.3.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PARA VALORACIONES

La obtención de extractos a partir de caldos de fermentación⁴ para posterior valoración de actividades antimicrobianas y antitumorales, traducido todo ello en producción de tiocoralinas, fue el punto clave del trabajo experimental de mejora de medios y efecto de las adiciones.

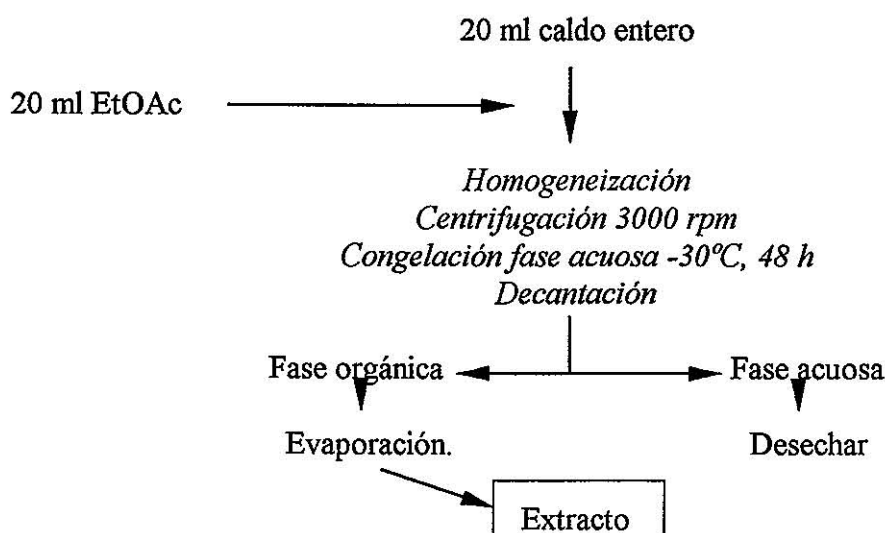
La metodología empleada para la valoración de la actividad de los extractos fue la siguiente (*Esquema 4.1*):

- Se extrajeron 20 ml de caldo entero con igual volumen de acetato de etilo (EtOAc).
- Se homogeneizó la mezcla con Ultraturrax T-25 durante 30 segundos para provocar la ruptura de membranas y paredes celulares.
- Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. para facilitar la decantación entre las fases acuosa (inferior) y orgánica (superior).
- Una vez realizadas dichas operaciones, se conservó en arcón congelador a -30°C durante 48 h.
- Transcurrido dicho tiempo, la fase orgánica (no congelada) fue separada por decantación y secada a alto vacío en rotavapor hasta su total sequedad.

⁴ Por datos obtenidos dentro del Desarrollo de Proceso que Pharma Mar viene realizando, en el micelio se encuentra cerca del 65% del total de la tiocoralina obtenida, por lo que se hace imprescindible el tratamiento tanto del micelio como del caldo filtrado.

- El extracto obtenido fue solubilizado en 3 ml de cloroformo/metanol ($\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$) 9/1 y transferido a viales previamente tarados. Se secaron con N_2 y, una vez que se comprobó que no existían restos de solvente, fueron secados a alto vacío.
- Por diferencia de pesada se determinó el peso neto (expresado en mg extracto/ml para valoraciones en *Plackett y Burman* y *Optimización* y como mg extracto/l en *Efecto de las adiciones*, ya que se obtiene menor peso).
- Estos extractos fueron valorados antitumoralmente para conocer su IC_{50} frente a P388.

Esquema 4.1.- Obtención de extractos para valoraciones



4.4.- EXTRACCIÓN DE CALDOS DE FERMENTACIÓN⁵

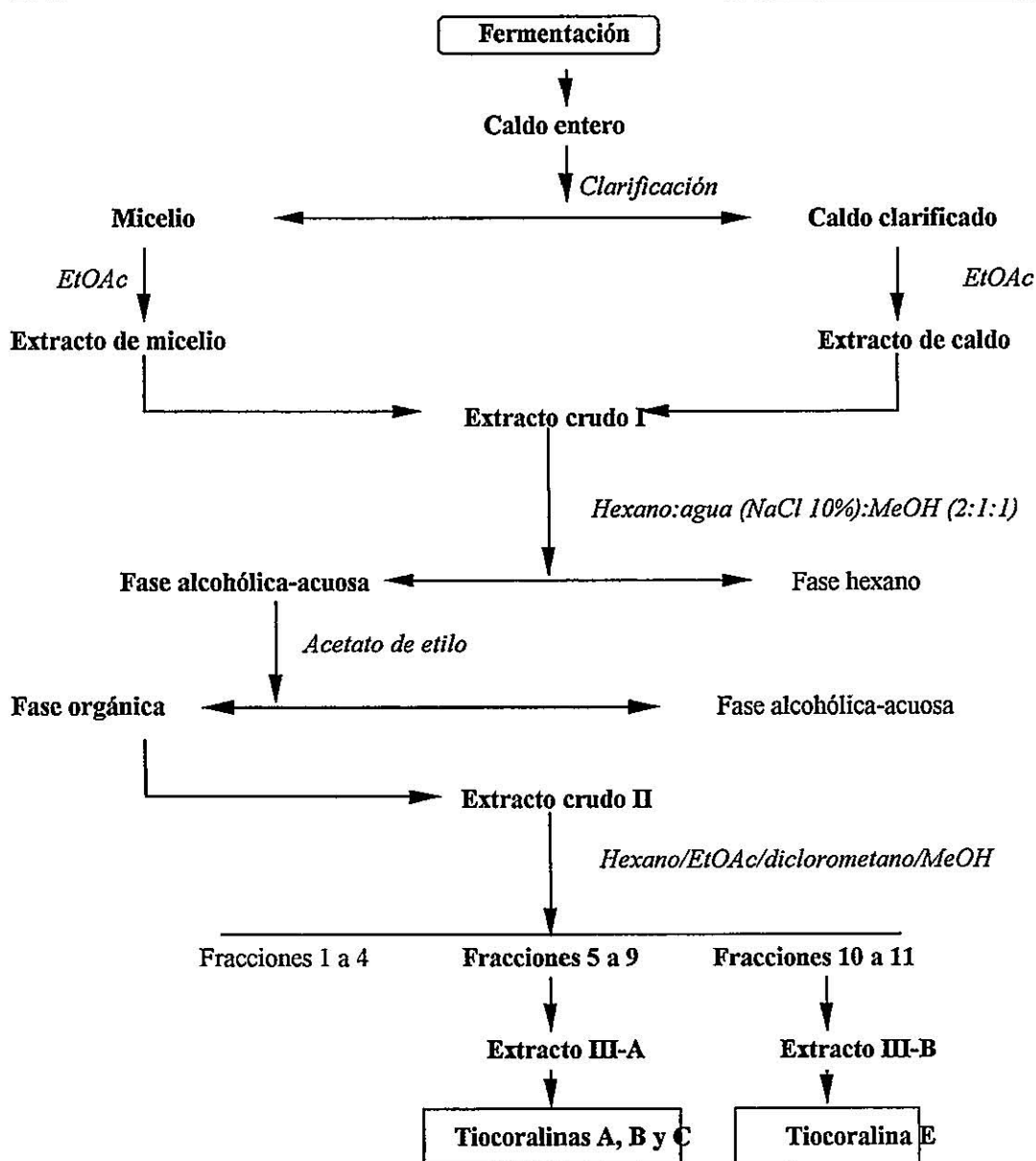
- Una vez realizada la descarga (para 50 l) del medio de cultivo, fue necesaria la separación del micelio (sólidos) del caldo clarificado (líquido), para ello, se empleó una centrífuga-clarificadora continua (*Sharples*) donde se consiguió separar rápidamente los sólidos del líquido.
- Sobre cada uno de ellos se efectuaron las extracciones con acetato de etilo (EtOAc)⁶.
- Para el micelio, después de su agitación y homogeneización, se realizó una prefiltración por tamiz de 1 mm de paso de poro.
- Posteriormente, se filtró por placa porosa bajo alto vacío.
- Una vez obtenido el filtrado, se evaporó por acción de alto vacío y condensación del solvente (rotavapores de 10 l) hasta obtener un extracto rojizo.

⁵ La *extracción* es el proceso por el cual se consigue extraer las tiocoralinas desde el caldo de fermentación a un disolvente orgánico, donde después de evaporarlo se obtiene un extracto sólido enriquecido en nuestros compuestos.

⁶ Fue importante dotar al sistema de agitación tanto sólido-líquido como líquido-líquido de una buena mezcla así como de un eficaz sistema de separación de fases.

- La extracción del caldo clarificado se realizó en una cuba agitada de extracción, antideflagrante y la separación de la fase acuosa (no interesante) de la orgánica (con nuestros compuestos) se realizó a través de una centrífuga-separadora líquido-líquido que separa por centrifugación atendiendo a las diferentes densidades.
- La fase orgánica fue evaporada en un rotavapor de 20 l empleando alto vacío y condensación.
- El extracto obtenido, de semejante calidad al anterior, determinada por valoraciones biológicas, fue unido a éste para conseguir un único crudo.

Esquema 4.2.- Extracción del caldo de fermentación para obtención de tiocoralinas



- Este crudo fue sometido a una nueva extracción para eliminar impurezas. El proceso se realizó con una mezcla 2:1:1 de hexano:agua (NaCl 10%):metanol, agitando y dejándolo decantar.
- Se desechó la fase de hexano.
- Posteriormente, se recuperó el compuesto de la fase alcohólica-acuosa por la extracción con acetato de etilo, evaporando éste último y obteniendo un nuevo extracto, de menor peso pero de mayor actividad antitumoral.
- El siguiente paso fue la extracción por diferente solubilidad empleando un gradiente de hexano/acetato de etilo/diclorometano/metanol (desde 9/1/0/0 a 0/0/0/1). Las fracciones ricas en tiocoralinas A, B y C (TA, TB y TC), de la 5 a la 9 que fueron eluidas principalmente con acetato de etilo, fueron evaporadas todas juntas para conseguir un nuevo extracto (Extracto III) que fue posteriormente purificado.
- La tiocoralina más polar, E, fue extraída en las últimas fracciones, fundamentalmente desde $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1 a 1/1.
- En éste último paso de extracción, la tiocoralinas ya pudieron ser minuciosamente seguida por técnicas de cromatografía en capa fina (TLC).

4.5.- MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE TIOCORALINAS⁷

4.5.1.- Cromatografía en columna

Es la técnica más ampliamente empleada para separar posibles impurezas del compuesto que se pretende purificar. Para ello, se emplearon columnas esmeriladas de vidrio que se rellena con el gel apropiado (fase estacionaria) y se fueron eluyendo las muestras gracias a la acción de la fase móvil ayudada por presión de aire. Las interacciones de los compuestos con el relleno determinaron la eficacia del sistema separador. Las fracciones recogidas fueron visualizadas por TLC.

4.5.1.1.- Sílice en fase normal

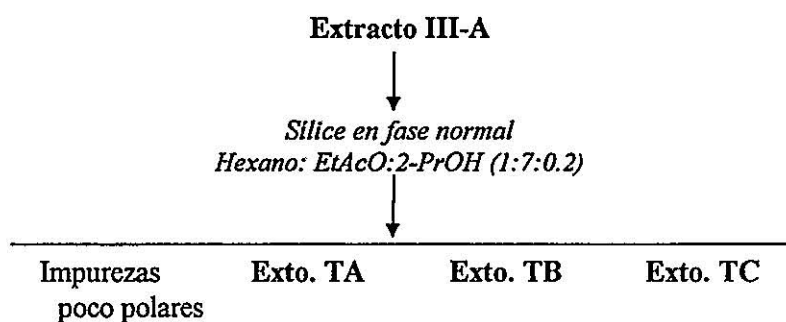
Purificación de TA, TB y TC:

El extracto III-A, de coloración rojiza intensa, fue disuelto en la mínima cantidad posible de una mezcla de hexano:acetato de etilo:isopropanol (1:7:0.2) y aplicado sobre una columna de sílice normal, impregnada en el mismo eluyente. La cantidad de relleno, así como del volumen de la columna y el de las fracciones, dependieron directamente de la cantidad de muestra a procesar. Fue recomendable graduar el flujo de la fase móvil por la utilización de un pequeño compresor de aire. Nuestros compuestos fueron eluyendo y cada fracción fue recogida individualmente. En este proceso fue muy importante la correcta utilización del TLC como factor de decisión en la recolección de fracciones con

⁷ Entendemos *Purificación* como el proceso por el cual se obtiene compuesto suficientemente puro a partir del extracto obtenido en la extracción.

una única mancha por UV, ya que tanto las primeras como las últimas fracciones conteniendo nuestro producto podían estar contaminadas con pequeñas impurezas y hubo que desecharlas. La unión de todas las fracciones *semilimpias* nos dieron, al evaporarlas en rotavapor, un sólido amarillento-pálido, que fue un extracto enriquecido en cada una de las tiocoralinas A, B y C.

Esquema 4.3.- Cromatografía de sílice para purificación de tiocoralinas A, B y C

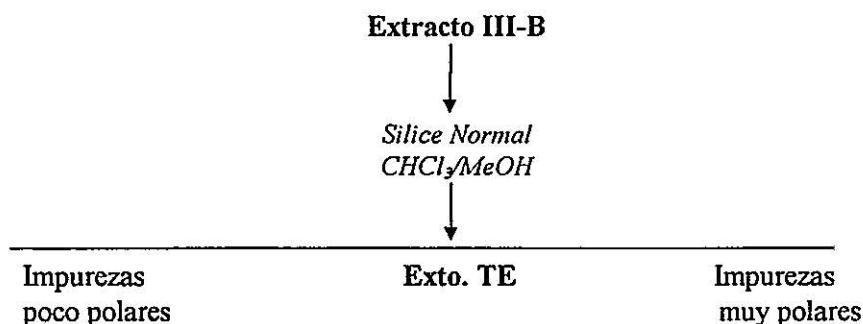


Exto. TA: Extracto enriquecido en tiocoralina A
 Exto. TB: Extracto enriquecido en tiocoralina B
 Exto. TC: Extracto enriquecido en tiocoralina C

Purificación de TE:

La fase móvil empleada en este caso es una mezcla de cloroformo y metanol, a modo de gradiente de polaridad. Se empieza por CH_3Cl sólo, para ir aumentando la polaridad de 1/0, 98/2, 95/5, 9/1, 4/1, 1/1, 1/9 y 0/1.

Esquema 4.4.- Cromatografía de sílice para purificación de tiocoralina E



Exto. TE: Extracto enriquecido en tiocoralina E

4.5.1.2.- Sílice en fase reversa

Es la técnica cromatográfica empleada para *limpiar* las fracciones enriquecidas en TB, TC y TE. En este caso, el relleno fue una sílice derivatizada con cadenas de 18 carbonos. La fase móvil utilizada fueron diferentes mezclas de agua y acetonitrilo. La tiocoralina más polar (TE) fue eluida con agua/acetonitrilo 2/1, mientras que la TC fue eluida con 1/2 y la TB con 1/3.

4.5.1.3.- Cromatografía de filtración por LH-20

LH-20 es una resina que permite una separación por tamaño molecular, eluyendo primero los compuestos de mayor peso molecular, y siendo los más pequeños retardados al recorrer los microporos que forma la resina⁸.

4.5.2.- Precipitación y cristalización

Precipitación

- El proceso de precipitación fue realizado solubilizando el compuesto aislado en la cromatografía descrita anteriormente en la mínima cantidad posible de cloroformo, diclorometano o acetato de etilo.
- Posteriormente se fue añadiendo metanol o hexano a la vez que se agita hasta la obtención de un precipitado.
- Este precipitado se filtró y se lavó varias veces con mezclas de hexano/MeOH, obteniéndose un sólido blanquecino que fue secado a alto vacío hasta la total desaparición de los disolventes.

Cristalización

- La TA con mayor pureza posible (> 99%), fue solubilizada con la mínima cantidad posible de CH₂Cl₂, calentando ligeramente en baño sonicador hasta su total disolución.
- Se fue añadiendo cuidadosamente hexano hasta observar un ligero enturbamiento, que desapareció al volver a calentar.
- Este matraz se cerró con Parafilm y se guardó en nevera a +5°C durante 48-72 h.
- Transcurrido dicho tiempo, se visualizaron los cristales formados
- Dichos cristales se recogieron cuidadosamente y se lavaron con una mezcla fría de hexano/EtOAc 1/5.
- Se filtraron y secaron en desecador durante 7 días.
- Se seleccionaron los óptimos por visualización en microscopía óptica (objetivo 10x).
- El cristal presentó una celdilla unidad del sistema ortorrómbico P (*Maestro*, 1998, comunicación personal)

⁸ Al tener toda la familia de tiocoralinas similares peso moleculares, ésta técnica no fue apropiada para separar tiocoralinas, sino para acabar de limpiar las fracciones.

4.6.- MÉTODOS ANALÍTICOS

Son métodos empleados para valorar cuantitativamente (HPLC) y cualitativamente (TLC) la pureza de los compuestos.

4.6.1.- Cromatografía en capa fina (TLC) de tiocoralinas

Las cromatoplas empleadas en todos los casos fueron de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) Para visualizar la TA, se comenzó empleando el sistema CH₃Cl/EtOAc/AcOH 1/9/0.15 (Pérez-Baz *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 1994). Como fruto de ésta tesis se identificaron nuevas tiocoralinas (TB, TC y TE) y se optimizó el sistema de separación utilizando Hex/EtOAc/2-PrOH 1/7/0.2.

La visualización del grupo de la TE se realizó empleando CH₃Cl /MeOH 9/1 como fase móvil y detección a 360 nm.

Además de los tres sistemas anteriormente mencionados, también se empleó la fase móvil compuesta por EtOAc: CH₃Cl (1:4) y se determinaron los R_f (cociente entre las distancias recorridas por el compuesto y el frente).

4.6.2.- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de tiocoralinas

El grupo de trabajo de Pérez-Baz (1997) recomendó la utilización de una columna C₁₈ radial-pack (10 µm) empleando MeOH:H₂O:CF₃COOH 90/10/0.1 como fase móvil. El flujo empleado fue de 2 ml/min y la detección a 360 nm para la TA.

En 1994, Okada y sus colaboradores utilizaron columna Inersil ODS (250 x 4.6 mm i.d.) con NaOAc 20 mM, pH 6.5:MeCN (35:65) como fase móvil. El flujo fue de 1 ml/min y la detección a 280 nm, para el compuesto BE-22179 (=TC).

El Departamento de Analítica de Pharma Mar (Floriano, 1996, comunicación personal) aconsejó la utilización de columna C₁₈ Zorbax SB (3.5 µm) y, como fase móvil, un gradiente de H₂O:acetonitrilo (40%-90% en 20 min.), lo que permitió detectar las cuatro tiocoralinas. Este ha sido el método empleado para el análisis de la pureza de los compuestos.

4.7.- DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE SOLUBILIDADES

Se valoró por visualización directa a través de lupa binocular de los compuestos en estado de polvo sólido.

Para ello, se realizó la siguiente experimentación:

- Sobre un vidrio de reloj se depositó 1 mg de cada una de la tiocoralinas totalmente secas, procurando que las partículas fueran del menor tamaño posible.
- Se añadieron cuidadosamente 100 μ l del disolvente a estudiar por las paredes del vidrio, y se continuó añadiendo gota a gota del mismo hasta observar la desaparición de las partículas. Dicha observación se realizó con ayuda de una lupa.

El grado de valoración dependió de los siguientes puntos:

- Rapidez de disolución de las partículas en contacto con el disolvente
- Desaparición total o reducción del tamaño de las partículas
- Volumen necesario para la total desaparición de partículas

Se establecieron los siguientes baremos:

Totalmente soluble	(++):	Desaparecen todas las partículas con 100 μ l
Parcialmente soluble	(+):	Desaparecen todas las partículas con 500 μ l
Poco soluble	(+/-):	Restos sólidos después de añadir 1 ml
Escasamente soluble	(-):	Restos sólidos después de añadir 5 ml
Totalmente insoluble	(--):	Partículas enteras después de añadir 5 ml

Métodos de detección de la actividad biológica

4.8.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

4.8.1.- Determinación de la concentración mínima inhibidora (MIC) en medio líquido

Esta medida se basa en la cuantificación de la mínima concentración de droga capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos.

A.- Preparación de los inóculos

- Se inocularon tubos de 16 mm de diámetro con 5 ml del medio Müller-Hinton con colonias que habían sido previamente cultivadas sobre placas Petri.
- Se incubaron en armario agitador a 30°C y 250 rpm durante 12 h.
- Se ajustó la densidad óptica a valores cercanos a 1.0 diluyendo con solución salina estéril.

B.- Preparación de placa microtiter

- Se utilizaron placas microtiter de 96 pocillos, con una capacidad aproximada de 500 μ l/pocillo.

- Se dispensaron en cada pocillo 200 μ l de Müller-Hinton, excepto en el primero, al que se añadió un volumen doble.
- En el primer pocillo se depositaron 51.2 μ l de cada solución de compuesto (TA, TB, TC, TE y equinomicina preparadas a 1 mg/ml en DMSO), con lo que la concentración final de cada una de ellas era de 128 μ g/ml.
- A partir de éste, se fueron haciendo diluciones seriadas a la mitad por el transvase de 200 μ l al siguiente pocillo, para conseguir concentraciones de 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.075 μ g/ml. En caso de no detectarse crecimiento, se diluyeron hasta 0.0003 μ g/ml.
- Se inoculó cada pocillo con 12.5 μ l de la solución previamente ajustada.
- Se dejó incubar en estufa a 30°C durante 12 h.
- Se procedió a la medida de la absorbancia en espectrofotómetro a 570 nm.
- Se consideró MIC aquella concentración cuya lectura fue igual al control (sólo medio de cultivo).

Se utilizaron las siguientes cepas:

Como Gram positivo: *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538-P) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

Como Gram negativos: *Escherichia coli* (ATCC 10536) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

4.8.2.- Medida de los halos de inhibición del crecimiento en medio sólido

Se trata de un método complementario al anterior que aportó información sobre la difusión de las drogas en el agar. Se basa en la lectura del diámetro de los halos de inhibición producidos por una cantidad de muestra determinada depositada en discos de 6 mm de diámetro de celulosa que se colocan sobre el medio.

A.- Preparación de inóculos

- A partir de los tubos de crecimiento anteriormente descritos, se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml del medio BHI (Brain Heart Infusion).
- Se incubó toda la noche a 30°C en armario agitador a 250 rpm.
- Semidió la absorbancia a 570 nm y se ajustó la D.O. a 1:0 diluyendo con solución salina estéril.

B.- Preparación de las placas de ensayo

- Se añadió un 2% de inóculo a 250 ml de BHI con 1.5% de agar a 40°C después de haber sido esterilizado.
- Se agitó ligeramente y se distribuyó a razón de 15 ml por placa, dejándolas solidificar a temperatura ambiente.
- Las placas se conservaron en nevera a +5°C hasta el momento del ensayo.

C.- Aplicación de las muestras

- Fue realizada sobre discos de celulosa de 6 mm de diámetro dejando evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Una vez secos, fueron depositados directamente sobre las placas sin proceder a ningún tipo de predifusión.

D.- Lectura de los halos de inhibición

- Se realizó después de 12 horas de incubación a 35°C, dando validez a los resultados siempre y cuando el halo de inhibición correspondiente a 30 µg de vancomicina (control para Gram positivos), esté comprendido entre 1.9 y 2.1 cm de diámetro.
- Se utilizaron las siguientes cepas:
 - Como Gram positivo: *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).
 - Como Gram negativo: *Escherichia coli* (ATCC 10536) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

4.9- ACTIVIDAD ANTITUMORAL

4.9.1.- Preparación de ensayos antitumorales

La metodología empleada para la detección de la actividad antitumoral es una modificación del método descrito por Bergeron y su equipo (1984). Podría quedar resumida en los siguientes puntos:

A.- Crecimiento de las células tumorales inmortalizadas: Cada una de las líneas empleadas (P388, A549, HT29) fueron cultivadas hasta alcanzar la fase estacionaria en el medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (Seromed T-437-10) suplementado con bicarbonato sódico (0.84 g/l), penicilina G (1 g/l), sulfato de estreptomicina (1 g/l) y 5% de suero fetal bovino. Este es el medio denominado MEM 5FCS.

B.- Aplicación de las muestras a ensayar: Se dispensaron a partir de una concentración conocida, y disueltas en DMSO/MeOH, a razón de 20, 10, 5 y 2.5 µl en pocillos de 16 mm de diámetro de la placa de ensayo.

C.- Incubación de las células con las muestras: A cada pocillo conteniendo la muestra, se añadió 1 ml de MEM 5FCS con las células a una concentración de 1×10^4 para P388 y 2×10^6 para las restantes líneas celulares. Igualmente, se prepararon controles de crecimiento en pocillos sin la muestra en estudio. Posteriormente, se incubaron durante 3 días a 37°C, con 5% CO₂ y 98% de humedad.

D.- Lectura de resultados: Transcurrido dicho periodo de tiempo, se realizó el conteo de las células en un contador electrónico de partículas (Coulter Counter), determinándose la IC₅₀ como aquella concentración de compuesto que inhibe el 50% del crecimiento celular.

4.9.2.-Preparación de las muestras a ensayar

4.9.2.1.- Extractos

- Una vez obtenido el extracto, se secó a alto vacío y se pesó en una balanza analítica.
- Se disolvió por sonicación en CH₃Cl /MeOH (9/1) hasta llevarlo a una concentración de 10 mg/ml, tapando el vial para impedir su evaporación.
- Sobre tubos Eppendorf de 1.5 ml se dispensaron 100 µl del extracto disuelto para conseguir aproximadamente 1 mg para ML1 y *S. triostinicus*, y 200 µl para ACM2 y *Nocardioides* para conseguir 2 mg.
- Se secaron bajo atmósfera de N₂ hasta su total evaporación.
- Una vez comprobada visualmente la sequedad del extracto, se disolvió en 100 µl de DMSO, tapando herméticamente el tubo y sonicando durante 5 min. hasta la total disolución de la muestra.
- Se añadieron 900 µl de MeOH para alcanzar las concentraciones de 1 mg/ml para ML1 y *S. triostinicus* y de 2 mg/ml para ACM2 y *Nocardioides*.
- Las diluciones posteriores se efectuaron al pipetear 100 µl de las anteriores concentraciones y 900 µl de MeOH.

En el caso de los extractos, sólo se valoró la inhibición sobre P388 al ser ésta la línea más utilizada en el *screening* habitual de actividades de Pharma Mar.

4.9.2.2.- Compuestos

Para valorar compuestos, se partió de una concentración inicial de 100 µg/ml en DMSO/MeOH (1/9), diluyendo posteriormente con el mismo disolvente hasta alcanzar la IC₅₀.

4.9.3.- Cálculo de la potencia antitumoral (PAT)

Tal y como se expuso en el apartado 4.6, además de la **calidad** antitumoral del extracto hay que tener en cuenta la **cantidad** del extracto conseguida; por ello, se definió el término arbitrario de potencia de la actividad antitumoral (PAT) para relacionar ambos conceptos y obtener, a modo comparativo, una cuantificación del resultado que se ha obtenido en cada una de las pruebas de mejora de medios, optimización y adición de aminoácidos y grupos cromóforos análogos.

Al ser la IC₅₀ inversamente proporcional a la actividad (lógicamente, a menor IC₅₀ corresponde una mayor actividad citotóxica), la PAT viene definida por la siguiente fórmula:

$$PAT = \frac{\text{mg extracto/ml}}{IC_{50} (\mu\text{g/ml})}$$

Métodos de biología molecular

4.10.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE TOPOISOMERASA II

4.10.1.- Sin extracción del plásmido

Se ensayó según el método descrito por Hsiang y sus colaboradores en 1985, con pequeñas modificaciones.

- En un volumen final de 20 μ l, conteniendo Tris-ClH 10 mM, pH 7.9, NaCl 50 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 0.1 mM, 15 μ g/ml de albúmina de suero bovino, ATP 1 mM y 150 ng de plásmido pBR322 DNA⁹ (Gibco), se añadieron los compuestos en estudio a unas concentraciones finales de 10, 1 y 0.1 μ g/ml en DMSO 10% (concentración final de DMSO de 1%).
- En los casos en que la reacción se realizó en presencia de enzima, se añadieron a estos tubos 3 U de topoisomerasa II (*Drosophila melanogaster*, USB).
- La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 min.
- La reacción se paró por adición de 2 μ l de SDS 10% y 1 μ l de proteinasa K (1 mg/ml).
- Se incubó de nuevo a 37°C durante 1 h.
- Se añadieron 2 μ l de tampón de carga (0.25% azul de bromofenol, 50% glicerol) a cada muestra.
- Las muestras se sometieron a electroforesis en agarosa al 1% con Tris-acético 40 mM, pH 8 y EDTA 1 mM, a 10 V/cm durante 1-1.5 h.¹⁰
- Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.05 μ g/ml) durante 15 min. y se lavaron durante otros 15 min. con agua destilada.
- Una vez terminada la electroforesis, se visualizaron las bandas con luz UV₂₅₄ y se fotografiaron.

4.10.2.- Con extracción del plásmido

Para eliminar el exceso de compuesto y/o enzima y así poder estudiar el comportamiento electroforético del plásmido después de haber sido incubado con el compuesto en estudio, se procedió de la siguiente manera:

- Se realizó la reacción de la manera descrita en el apartado 4.13.1.
- Una vez incubada la mezcla de reacción a 37°C durante 30 min. y antes de añadir el SDS y la proteinasa K, se procedió a la extracción del plásmido.
- Se añadieron a cada muestra 200 μ l de Tris-ClH 10 mM, EDTA 1 mM.

⁹Se seleccionó el plásmido de *E. coli* pBR322 al ser más el más utilizado en los habituales screening de Pharma Mar, además de ser el que Yoshinari y colaboradores utilizaron en 1994 para trabajar con BE-2279.

¹⁰ En las ocasiones en que la electroforesis se efectuó en presencia de bromuro de etidio, los geles se lavaron como se describe anteriormente antes de visualizar las bandas con luz UV.

- Se añadieron 200 μ l de fenol: CH_3Cl :alcohol isoamílico 25:24:1
- Después de agitar se centrifugaron 10 min. a 14.000 rpm y se separó la fase acuosa.
- Sobre ella, se añadieron 50 μ l de una solución de acetato amónico 2.5 M con tRNA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se agitó de nuevo.
- Se añadieron 500 μ l de EtOH absoluto a -20°C y se dejó a -70°C durante 15 min.
- Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 15 min. a 14.000 rpm y se decantó el sobrenadante.
- El precipitado se resuspendió en 20 μ l de Tris-ClH 10 mM, EDTA 1 mM.
- Se añadieron 2 μ l de tampón de carga (0.25% azul de bromofenol, 50% glicerol) a cada muestra.
- Las muestras se sometieron a electroforesis en agarosa al 1% con Tris-acético 40 mM, pH 8 y EDTA 1 mM, a 10 V/cm durante 1-1.5 h.
- Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 15 min. y se lavaron durante otros 15 min. con agua destilada.
- Una vez terminada la electroforesis, se visualizaron las bandas con luz UV_{254} y se fotografiaron.

5.- RESULTADOS

5.1.- COMPARACIÓN QUIMIOTAXONÓMICA DE CEPAS PRODUCTORAS DE TIOCORALINAS, SANDRAMICINAS Y TRIOSTINAS.

5.1.1.- Utilización de fuentes de carbono y pruebas bioquímicas

Las cuatro cepas productoras de compuestos quinoxalínicos (trioquinas) y quináldicos (tiocoralinas y sandramicina), *Micromonospora sp.* ML1, *Micromonospora sp.* ACM2, *Nocardioides sp.* ATCC 39419 y *Streptomyces trioquinicus* ATCC 21043 se sometieron a una serie de pruebas fisiológicas y bioquímicas para su comparación. Los resultados se reflejan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1.- Consumo de fuentes de carbono y sustratos bioquímicos

Sustratos	TIOCORALINAS		SANDRAMICINA	TRIOSTINAS
	<i>Micromonospora</i> ML1	<i>Micromonospora</i> ACM2	<i>Nocardioides sp.</i> ATCC 39419	<i>Streptomyces</i> <i>trioquinicus</i> ATCC 21043
Adonitol	-	-	-	-
Arabinosa	-	-/+	-	-
Celobiosa	-/+	-	-/+	-
Dulcitol	+	-	-	-
Fructosa	+	-	+	+
Glucosa	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	+
Maltosa	+	-	+	-
Manitol	+	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-/+	-
Ribosa	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+
Sorbitol	-	+	+	+
Trehalosa	+	-	-	-
Xilosa	+	+	+	+
Arginina	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-
Fosfatasa	+	-	-	+
α -glucopiranosido	+	+	+	+
β -glucoranida	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-
Piroglutamato	-	-	-	-
NaCl (6.5%)	-/+	-/+	-	-
Catalasa	+	+	+	+
Hemólisis	-	-	-	-
Urea	+	+	-	-

+: Crecimiento o reacción positiva. -: ausencia de crecimiento o reacción negativa. -/+: resultado dudoso

5.1.2.- Sensibilidad a antibióticos

La diferente sensibilidad de las cuatro cepas a compuestos con acción antibiótica quedó reflejada en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2.- Sensibilidad a antibióticos de cepas productoras de antitumorales quinoxalínicos y derivados

Antibiótico	<i>Micromonospora</i> sp. ML1	<i>Micromonospora</i> sp. ACM2	<i>Streptomyces</i> <i>triosanicus</i> ATCC 21043	<i>Nocardia</i> sp. ATCC 39419
	MIC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MIC (µg/ml)
Amikacina	≤4 (S)	≤4 (S)	≤4 (S)	≤4 (S)
Amoxi/Clavulánico	≤2 / 1 (S)	≤2 / 1 (S)	16/8 (I)	≤2 / 1 (S)
Ampicilina	2 (S)	4 (S)	>16 (R)	0.5 (S)
Bacitracina	>0.075ud(S)	>0.075ud(S)	>0.075ud(S)	<0.075ud(R)
Cefazolina	2 (I)	>4 (R)	>4 (R)	≤1 (S)
Cefoxitina	2 (S)	0.2 (S)	>4 (R)	>0.01, ≤0.1(S)
Cefuroxima	2 (S)	≤0.2 (S)	>4 (R)	1 (S)
Cloramfenicol	≤8 (S)	≤8 (S)	≤8 (S)	>8 (R)
Ciprofloxacina	>0.1 ≤1 (S)	>0.1 ≤1 (S)	2 (I)	2 (I)
Clindamicina	2 (R)	1 (I)	>2 (R)	>2 (R)
Eritromicina	1 (I)	4 (I)	≤0.5 (S)	1 (I)
Estreptomicina 1000	≤1000 (S)	≤1000 (S)	≤1000 (S)	≤1000 (S)
Fosfomicina	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)
Gentamicina	≤2 (S)	≤2 (S)	≤500 (S)	≤500 (S)
Gentamicina 500	≤500 (S)	≤500 (S)	≤500 (S)	≤500 (S)
Novobiocina	>1.4 (R)	>1.4 (R)	<1.4 (S)	<1.4 (S)
Ofloxacina	4 (I)	>0.1 ≤2 (S)	4 (I)	4 (I)
Optoquina	>4.5(R)	>4.5(R)	>4.5(R)	>4.5(R)
Oxacilina	4 (R)	≤1 (S)	>4 (R)	≤1 (S)
Penicilina	1 (R)	>8 (R)	>8 (R)	0.5 (R)
Rifampicina	>0.1, ≤1 (S)	>0.1 ≤1 (S)	2 (I)	>2 (R)
Teicoplanina	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	16 (I)
Tetraciclina	≤4 (S)	≤4 (S)	8 (I)	≤4 (S)
Tiocoralina A	>10.000 (R)	>10.000 (R)	<1.000	<5.000
TMP/SMX ¹	≤1/19 (S)	≤1/19 (S)	>2/38 (R)	≤1/19 (S)
Vancomicina	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	>16 (R)

¹Trimetoprina/Sulfametoxazol

5.1.3.- Tolerancia a sales marinas

La resistencia de las cuatro cepas al crecimiento en condiciones salinas, se determinó de manera comparativa. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 5.1.

Gráfica 5.1.- Tolerancia a crecimiento en condiciones halófilas



5.2.- FERMENTACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE TIOCORALINAS

5.2.1.- Efecto de nutrientes sobre el crecimiento y producción de las cepas productoras de tiocoralinas, triostinas y sandramicina por la técnica de Plackett y Burman.

Los cuatro microorganismos productores fueron fermentados con los medios diseñados según el método de Plackett y Burman. Las concentraciones y los medios ensayados se describen en Materiales y Métodos. El efecto de las variaciones de los componentes de los medios de cultivo tanto sobre el crecimiento celular como sobre la producción de los antibióticos se muestra a continuación.

5.2.1.1.- Efecto sobre el CRECIMIENTO celular

El crecimiento celular se determinó a las 96 y 144 horas de incubación en los diferentes medios ensayados. Los resultados se describen en la Tabla 5.3

Tabla 5.3.- Crecimiento :Valores de volumen miceliar (V_m)¹ a 96 h y 144 h

Ref	$V(0h)$	<i>Micromonospora</i> sp. ML1		<i>Micromonospora</i> sp. ACM2		<i>Nocardioide</i> sp. ATCC 39419		<i>Streptomyces</i> <i>triostinicus</i> ATCC 21043	
		96 h	144 h	96 h	144 h	96 h	144 h	96 h	144 h
1	1	16.8	19	15.7	18	21.5	23	31.5	35.5
2	2.5	19.5	29.3	18	20.8	22.5	22.5	19.5	25
3	1	11.3	13.8	7.3	12.3	11.5	9.5	15	11
4	0.5	10.3	8.8	18.7	15	19.5	20.5	15	17
5	0.5	11.5	19	13.5	17.5	19	20	13.5	11.5
6	1	17.8	13	14.5	14	13.5	13.5	26	30
7	1	25.8	32	20.8	21.8	19	21	28	34
8	1	14.7	19.8	13	17.3	13	15	15	13.5
9	<0.5	6.8	5.3	8.8	4.8	3.5	3.5	10.5	11
10	1	11	9.3	7.7	6	15	16.5	10.5	7.5
11	1	6.3	11.8	7.3	5	17	15.5	11	10.5
12	0.5	11.5	8.3	14.8	11	12.5	14.5	8	9.5
13	0.5	7.7	10	11.3	9.5	14	12	8	6
14	0.5	10.3	12.5	13	11	15.5	15.5	11.5	9.5
15	1.5	22	27.8	17.3	15.8	20.5	19.5	14.5	22
16	<0.5	7.7	7	8.8	7.8	2.5	2.5	8.5	4

¹ V_m (en %) = $V_{m_a} - V(0h)$

A continuación se determinó el efecto global de cada nutriente sobre el crecimiento. Para ello, se halló la media de crecimiento obtenida para cada nutriente cuando fue empleado a baja o a alta concentración por separado. El efecto de cada nutriente vino determinado por la diferencia entre los sumatorios de los valores (+) y los valores de baja concentración (-).

Tabla 5.4.- Efecto¹ de cada variable sobre crecimiento

	<i>Micromonospora</i> sp. ML1		<i>Micromonospora</i> sp. ACM2		<i>Nocardioide</i> sp. ATCC 39419		<i>Streptomyces</i> <i>triostinicus</i> ATCC 21043	
	96 h	144 h	96 h	144 h	96 h	144 h	96 h	144 h
Glucosa	-0.5	-1.5	+1.5	+2.4	-0.6	-0.06	+4.4	+5.94
Almidón	+5.8	+12.3	+1.9	+6.2	+6.0	+5.94	+6.2	+8.56
Levadura	+6.8	+7.1	+5.1	+4.6	+6.8	+7.44	+8.4	+12.93
Malta	-0.2	-0.7	-0.9	-0.2	-0.2	-1.44	+1.8	+1.90
Peptona	+0.6	+2.9	+3.7	+3.4	+5.0	+4.32	-4.6	-3.69
HK ₂ PO ₄	-1.2	-1.9	+1.0	0	+2.6	+2.32	+1.2	+1.05
CaCO ₃	+0.6	-0.1	-1.7	-2.4	+1.6	+0.32	-2.6	-1.81

Efecto = $\Sigma(+)-\Sigma(-)$. Valores placebo: en sombra

Siguiendo las fórmulas detalladas en 4.2.4, y considerando las variables placebo a aquellas con menor efecto sobre el crecimiento, se calcularon los datos estadísticos mostrados en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5.- Varianza, error estándar y valores t de Student del crecimiento de cada cepa a 96 y 144 h

	<i>Micromonospora</i> sp. ML1		<i>Micromonospora</i> sp. ACM2		<i>Nocardioide</i> sp. ATCC 39419		<i>Streptomyces</i> <i>triostinicus</i> ATCC 21043	
	96 h	144 h	96 h	144 h	96 h	144 h	96 h	144 h
Varianza ¹	0.21667	0.91667	1.35333	1.93333	0.986667	0.72653	3.81333	2.66283
Error estándar ²	0.4654	0.9574	1.1633	1.3904	0.9933	0.8524	1.9528	1.6318
"t" para Glucosa	-0.93	-1.56	+0.78	+1.73	-0.60	-0.07	+2.25	+3.64
" Almidón	+12.46	+12.85	+1.63	+4.46	+6.04	+6.97	+3.17	+5.25
" Levadura	+12.61	+7.42	+4.38	+3.31	+6.85	+8.73	+4.30	+7.92
" Malta	-0.43	-0.73	-0.77	-0.14	-0.20	-1.67	+0.92	+1.16
" Peptona	+1.29	+3.03	+3.18	+2.45	+5.03	+5.07	-2.36	-2.26
HK ₂ PO ₄	-2.58	-1.98	+0.86	0	+2.62	+2.72	+0.61	+0.64
"CaCO ₃	+1.29	-0.10	-1.46	-1.73	+1.61	+0.38	-1.33	-1.11

¹Varianza (V_{ef}) = $\Sigma(Ed)^2$

n

²Error estándar (SE_{ef}) = $(\sqrt{V_{ef}})$

³t= Cálculo de la "t" de Student = $E_d/\sqrt{V_{ef}}$

El porcentaje de significación para tres grados de libertad se muestra en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6.- Coeficientes de confianza de cada variable sobre crecimiento.

	<i>Micromonospora</i> sp. ML1		<i>Micromonospora</i> sp. ACM2		<i>Nocardioide</i> sp. ATCC 39419		<i>Streptomyces</i> <i>triostinicus</i> ATCC 21043	
	96 h	144 h	96 h	144 h	96 h	144 h	96 h	144 h
Glucosa	Placebo		Placebo		Placebo		94%	97%
Almidón	99.9%	99.9%	90%	99.1%	99.6%	99.7%	96%	99%
Levadura	99.9%	99.8%	98%	97%	99.7%	99.9%	98%	99.8%
Malta	Placebo		Placebo		Placebo		Placebo	
Peptona	80%	97%	97.5%	96%	99.2%	99.2%	-95%	-95%
HK ₂ PO ₄	-96%	-93%	Placebo		96.5%	96.5%	Placebo	
CaCO ₃	Placebo		-86%	-87%	Placebo		Placebo	

5.2.1.2.- Sobre la PRODUCCION

El nivel de actividad antitumoral en los caldos de fermentación se determinó a las 144 h de incubación en los diferentes medios ensayados. Los resultados se describen en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7.- Resultados de cantidad de extracto obtenido y actividades biológicas de los mismos

	<i>Micromonospora</i> sp. ML1			<i>Micromonospora</i> sp. ACM2			<i>Nocardioide</i> sp. ATCC 39419			<i>Streptomyces</i> <i>triostinicus</i> ATCC 21043		
	mg/ml ¹	IC ₅₀ ²	mm ³	mg/ml	IC ₅₀	mm	mg/ml	IC ₅₀	mm	mg/ml	IC ₅₀	mm
	μg/ml	μg/ml	20 μg	μg/ml	μg/ml	200 μg	μg/ml	μg/ml	200 μg	μg/ml	μg/ml	20 μg
1	0.265	0.75	6.5	0.208	1.5	9.5	0.135	0.8	10.5	0.35	0.0011	20.5
2	0.391	0.25	8	0.465	1.5	9.5	0.25	0.9	10	0.545	0.0012	20.5
3	0.162	0.75	6.5	0.333	3.5	8	0.095	1.0	9.5	0.320	0.0045	16
4	0.464	1.0	7	0.413	1.0	10.5	0.205	0.75	10	0.500	0.0125	15
5	0.255	1.125	6.5	0.403	3.0	8.5	0.155	6.75	8.5	0.110	0.009	20
6	0.303	1.125	7	0.393	3.25	8	0.640	8.25	8.5	0.490	0.0053	19
7	0.281	0.5	7.5	0.375	2.6	9	0.235	6.25	9.5	0.270	0.0023	19.5
8	0.218	0.5	7.5	0.385	2.9	8.5	0.140	0.9	11	0.185	0.016	12
9	0.237	2.0	6.5	0.405	4.25	7.5	0.115	0.7	11	0.105	0.006	15.5
10	0.288	1.5	7	0.293	25	-	0.445	25.5	6.5	0.050	0.016	16.5
11	0.285	2.5	6.5	0.190	23	-	0.090	2.0	9.5	0.065	0.006	18
12	0.328	2.5	6.5	0.225	24	-	0.135	9.0	8	0.250	0.013	17
13	0.241	8.25	-	0.283	4.4	8	0.155	9.0	8	0.110	0.018	11.5
14	0.228	7.5	-	0.370	8.6	6.5	0.140	7.5	8.5	0.145	0.009	13
15	0.560	0.25	9	0.420	8.4	6.5	0.425	14.0	7.5	0.390	0.026	14.5
16	0.148	1.0	6.5	0.193	4.3	8	0.060	6.75	8.5	0.090	0.0028	17

¹mg/ml= mg extracto obtenido por ml de caldo. ²IC₅₀ frente a P388 en μg/ml. ³mm= diámetro (en mm) del halo de inhibición de 20 μg o 200 μg/disco frente a *Bacillus subtilis*

Para tener en cuenta tanto la cantidad de extracto obtenido como su calidad (actividad antitumoral), se definió el término de Potencias, siendo:

$$\text{PAT (Potencia de Actividad Antitumoral)} = \frac{\text{mg extracto de 1 ml de caldo entero}}{\text{IC}_{50} \text{ del extracto } (\mu\text{g/ml}) \text{ frente a P388}}$$

Las PAT fueron los valores usados para determinar el efecto de cada variable (E_a) en Tabla 5.8.

Tabla 5.8.- Valores de PAT de las cuatro cepas en los 16 medios probados

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
A	0.35	1.56	0.22	0.46	0.23	0.27	0.56	0.44	0.12	0.19	0.11	0.13	0.03	0.03	2.24	0.15
B	0.14	0.31	0.10	0.41	0.13	0.12	0.14	0.13	0.10	0.01	0.01	0.01	0.06	0.04	0.05	0.05
C	0.17	0.28	0.10	0.27	0.02	0.08	0.03	0.16	0.16	0.02	0.05	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01
D	318	454	71.1	40.0	12.2	92.5	117	11.6	17.5	3.1	26.0	19.2	6.1	16.1	15.0	32.1

A: *Micromonospora* ML1. B: *Micromonospora* ACM2. C: *Nocardioide* sp. D: *Streptomyces triostinicus*

Al igual que en el caso del crecimiento del apartado anterior, se determinaron los efectos de cada variable independiente restando a los resultados (PAT) obtenidos a concentraciones altas, los obtenidos al utilizar la variable a concentraciones bajas.

Tabla 5.9.- Efecto¹ de cada variable sobre PAT

	<i>Micromonospora</i> sp. ML1	<i>Micromonospora</i> sp. ACM2	<i>Nocardioides</i> sp. ATCC 39419	<i>Streptomyces</i> <i>triostinicus</i> ATCC 21043
Variable				
Glucosa	+0.00125	+0.1019	+0.13000	+99.560
Almidón	+0.54125	+0.0270	+0.02900	+99.905
Levadura	+0.52875	+0.0811	+0.04600	+107.615
Malta	-0.01375	-0.0417	-0.02825	-19.385
Peptona	+0.39375	+0.0621	+0.02575	+12.910
HK ₂ PO ₄	-0.41375	+0.0019	-0.01175	-3.035
CaCO ₃	+0.30125	-0.0597	-0.03325	+15.290
Efecto = $\sum(+)$ - $\sum(-)$. Valores placebo; en sombilla				

Siguiendo las fórmulas detalladas en Plackett y Burman, y seleccionando los tres componentes con menor efecto (ruido del muestreo) como variables placebo, se obtuvo la siguiente tabla:

Tabla 5.10.- Varianza, error estándar y valores t de Student sobre la producción

	<i>Micromonospora</i> sp. ML1	<i>Micromonospora</i> sp. ACM2	<i>Nocardioides</i> sp. ATCC 39419	<i>Streptomyces</i> <i>triostinicus</i> ATCC 21043
	Valor-t C.Coef. ⁴	Valor-t C.Coef. ⁴	Valor-t C.Coef. ⁴	Valor-t C.Coef. ⁴
Varianza ¹	0.0308810	0.0008235	0.001599	136.58486
Error estándar ²	0.17573	0.0286966	0.0399874	11.686952
"t" ³ para Glucosa	+0.007 Placebo	+3.551 98%	+3.251 97.3%	+8.519 +99.9%
" Almidón	+3.080 +96.7%	+0.941 Placebo	+0.725 Placebo	+8.548 +99.9%
" Levadura	+3.009 +96.5%	+2.826 96.5%	+1.150 Placebo	+9.208 +99.9%
" Malta	-0.078 Placebo	-1.453 Placebo	-0.706 Placebo	-1.659 -90.2%
" Peptona	+2.241 +94.7%	+2.164 +94.4%	+0.644 Placebo	-1.105 Placebo
HK ₂ PO ₄	-2.354 -95%	+0.066 Placebo	-0.294 Placebo	-0.260 Placebo
"CaCO ₃	+1.714 +90.3%	-2.080 -94%	-0.832 Placebo	+1.308 Placebo

¹Varianza de cada efecto (V_{ef}) = $\frac{\sum(Ed)^2}{n}$

²= Error estándar (SE_{ef}) = ($\sqrt{V_{ef}}$)

³t= Cálculo de la "t" de Student = $E_d/\sqrt{V_{ef}}$

⁴C.Conf.= Coeficiente de Confianza (%)

5.2.2.- Optimización del medio de producción según el modelo autodirigido de Hendrix de las cepas productoras de tiocoralinas

La técnica de Hendrix está basada en continuas reformulaciones de medios de cultivo en sustitución de los que peor potencia antitumoral han presentado en cada serie de fermentaciones. Para ello, se seleccionaron los nutrientes que mostraron una mayor influencia en la producción de actividad antitumoral y se formularon una serie de medios de cultivo donde se ensayaron diferentes concentraciones de estos componentes. Al finalizar la fermentación se analizó la potencia antitumoral de los caldos y se desecharon los medios en los que se detectó menor nivel de actividad. A continuación, y por cada medio desechado, se reformuló uno nuevo mediante el proceso descrito en

Materiales y Métodos. Se volvieron a fermentar los organismos en estos nuevos medios y se analizó la actividad antitumoral producida. Este proceso de sustitución de los peores medios y formulación de nuevos se repitió cuatro veces, desechándose cada vez los seis medios de menor potencia antitumoral.

Se tomó de partida la matriz empleada en Plackett y Burman. Los valores de concentración (g/l) de cada nutriente fueron evolucionando dependiendo de los cambios sufridos en las reformulaciones. Los valores de t representados en la tabla 5.11 y 5.12 representan los coeficientes de confianza obtenidos en el capítulo anterior. En Anexos se detallan las matrices utilizadas, así como los resultados completos obtenidos.

Tabla 5.11.- Evolución de los valores promedio (en g/l) de cada nutriente en las reformulaciones empleadas con la cepa ML1

	Gluc	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT ¹
t en P&B ²	Placebo	+97%	+97%	Placebo	+95%	-95%	+90%	
Media-1	16.5	22	5.5	5.5	5.5	0.55	2.75	0.095
Media-2	20.1	31.6	7.9	5.5	5.5	0.43	2.75	0.148
Media-3	19.5	35.9	10.4	5.5	7.7	0.35	3.76	0.163
Media-4	21.2	33.9	11.7	5.4	6.2	0.28	3.39	0.137
Media-5	17.9	34.8	11.8	5.4	7.2	0.25	5.00	0.196

PAT¹: Media aritmética de las PAT de los 6 peores valores (reformulados)

t en P&B²: Confianza según método de Plackett y Burman para 3 grados de libertad.

Glu = glucosa; Alm = almidón; Lev = levadura entera; Mal = extracto de malta; Pep = peptona

Tabla 5.12.- Evolución de los valores promedio (en g/l) de cada nutriente en las reformulaciones empleadas con la cepa ACM2

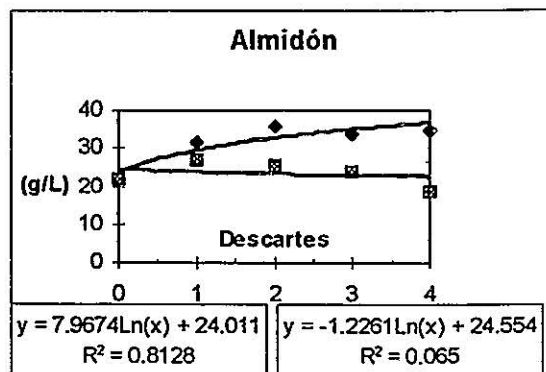
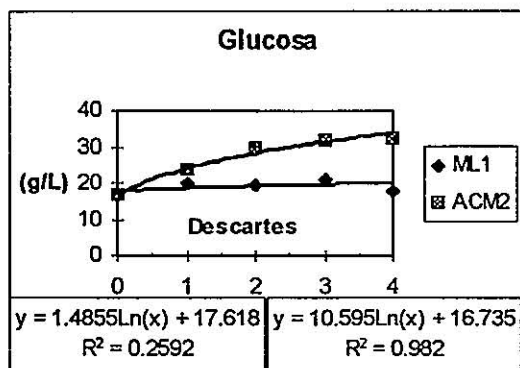
	Gluc	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT ¹
t en P&B ²	+98%	Placebo	+97%	Placebo	+94%	Placebo	-94%	
Media-1	16.5	22	5.5	5.5	5.5	0.55	2.75	0.028
Media-2	23.7	26.8	5.5	6.7	5.5	0.55	2.15	0.029
Media-3	29.5	25.2	6.6	3.9	5.5	0.55	1.89	0.031
Media-4	32.1	24	8.1	5.6	8.9	0.50	1.97	0.037
Media-5	32.6	18.9	7.4	4.7	9.1	0.48	2.50	0.036

PAT¹: Media aritmética de las PAT de los 6 peores valores (reformulados)

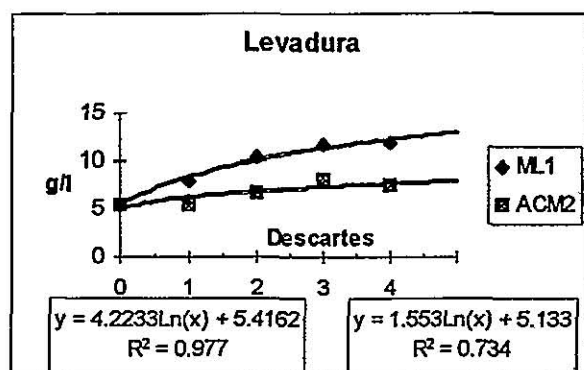
t en P&B²: Confianza según método de Plackett & Burman

Al ir representando gráficamente las evoluciones de las concentraciones de nutrientes calculadas, se obtuvieron los siguientes ajustes a líneas de tendencia logarítmica, al ser la que mejor se ajustó a los puntos obtenidos en aquéllos nutrientes que evolucionaron con mayor grado de significación.

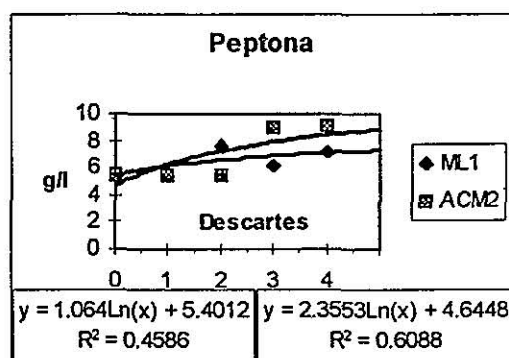
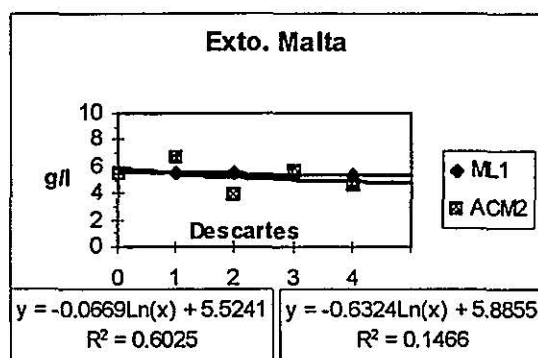
Gráficas 5.2 y 5.3.- Evolución de los promedios de glucosa y almidón timizando las series de reformulaciones.



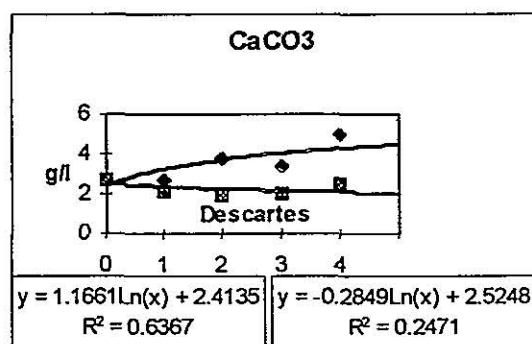
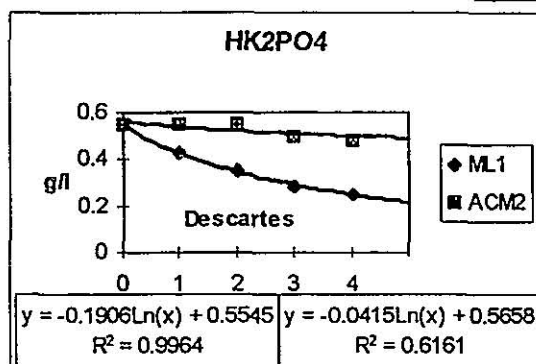
Gráficas 5.4.- Evolución de los promedios de levadura entera al ir optimizando las series de reformulaciones.



Gráficas 5.5 y 5.6.- Evolución de los promedios de extracto de malta y peptona al ir optimizando las series de reformulaciones



Gráficas 5.7 y 5.8.- Evolución de los promedios de HK_2PO_4 y CaCO_3 al ir optimizando las series de reformulaciones.



Sustituyendo en cada una de las fórmulas el valor de $x = 5$ (5 valores de x obtenidos: 4 descartes más el valor de partida), se obtuvieron los medios optimizados, representados en la Tabla 5.13.

Tabla 5.13.- Medios optimizados por la técnica unidireccional de Hendrix

	Glucosa	Almidón	Levadura	Malta	Peptona	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃
ML1	20	37.5	12.21	5.42	7.11	0.25	4.29
ACM2	33.78	22.5	7.63	4.84	8.43	0.50	2.98

Todos los valores en g/l. Suplementación de 10g/l de sales marinas.

Confirmación de la optimización:

Se realizaron fermentaciones de ambas cepas para comparar el efecto real de la optimización, utilizando el medio promedio de la matriz Plackett y Burman (Media-1 en tablas 5.11 y 5.12) como control a optimizar frente a los medios descritos en 5.13.

Se fermentaron en matraces Erlenmeyer de 2 litros con 250 ml de cada medio, se realizaron muestreos para medidas del crecimiento (como % VM) a 48, 72, 96, 144 y 192 h; los extractos se realizaron sobre caldo entero de 72, 96 y 144 h. La valoración de la actividad antitumoral se realizó frente a P388 (IC₅₀ de los extractos en µg/ml). Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 5.14.

Tabla 5.14.- Resultados obtenidos en la comprobación de la optimización unidireccional

Ref	ML1				ACM2			
	VM	mg/ml	IC ₅₀	PAT	VM	mg/ml	IC ₅₀	PAT
Control 48h	9	-	-	-	8	-	-	-
" 72h	12	0.18	2.5	0.072	11	0.12	5	0.024
" 96 h	14	0.27	0.5	0.54	12.5	0.15	3.25	0.046
" 144 h	11.5	0.26	0.5	0.52	11.5	0.16	1.5	0.107
" 192h	10	0.29	2	0.145	9	0.31	5.5	0.056
Optimiz-48h	9.5	-	-	-	9	-	-	-
" 72h	14	0.16	2.75	0.058	13	0.17	4.75	0.036
" 96 h	15.5	0.24	0.5	0.48	15	0.26	3.25	0.08
" 144 h	17	0.26	0.375	0.69	16	0.28	1.25	0.224
" 192 h	16	0.34	0.5	0.68	15	0.33	3.75	0.088

5.2.3.- Optimización según el modelo de diseño central compuesto de Box-Wilson de las cepas productoras de tiocoralinas

Técnica basada en el estudio de las respuestas obtenidas al diseñar una serie de medios de fermentación que combinan cuatro componentes del medio de fermentación ensayados a cinco niveles (concentraciones). Las variables se seleccionaron por su efecto sobre la fermentación mediante un diseño de Plackett y Burman. Cada una de las cinco concentraciones distintas a las que se ensayó cada componente se codificaron como -2, -1, 0, 1 y 2. Las ecuaciones de predicción se formularon para describir los efectos individuales X_i , las interrelaciones binarias X_iX_j , (entre dos variables), ternarias $X_iX_jX_k$ (modulación de la respuesta por interrelación entre tres elementos) y

para describir los efectos cuadráticas X_i^2 (curvatura del sistema). La bondad del ajuste de la ecuación de predicción a los datos reales se determinó por el coeficiente de Fisher.

5.2.3.1.- Cepa ML1

Las variables seleccionadas mediante el sistema de Plackett y Burman por su efecto sobre la fermentación de la cepa ML1 fueron almidón, peptona, levadura y fostato dipotásico.

Todos los medios contuvieron además glucosa 5g/l; CaCO_3 4 g/l y sales marinas 10g/l.

Los cuatros nutrientes seleccionados se ensayaron a cinco concentraciones diferentes que se codificaron como se especifica en la Tabla 5.15 para facilitar los cálculos. En este caso se seleccionó el valor (0,0,0,0) como almidón 30 g/l, peptona 3 g/l, levadura 10 g/l y fosfatos 5 mg/ml.

Tabla 5.15.- Concentraciones de nutrientes a emplear en la cepa ML1

Almidón	Peptona	Levadura	HK_2PO_4	Código
1	1	1	0	-2
15	2	5	0.5 mg	-1
30	3	10	5.0 mg	0
45	4	15	50 mg	+1
60	5	20	500 mg	+2

Todos los valores en g/l, excepto fosfatos.

El diseño de la matriz vino determinado por el diseño de Box-Behnker (Greasham e Inamine, 1988), equivalente al de Box-Wilson (Stroebel et al., 1993).

Tabla 5.16.-Medios de fermentación ensayados para la mejora del medio de fermentación mediante el sistema de correlación múltiple y resultados obtenidos en la cepa ML1. Las diferentes concentraciones de cada variable aparecen codificadas tal y como se muestra en la Tabla 5.15

Ref.	Alm	Pep	Lev	HK_2PO_4	mg/ml	IC_{50}	PAT
1	-1	-1	-1	-1	0.17	0.25	0.68
2	+1	-1	-1	-1	0.175	0.75	0.23
3	-1	+1	-1	-1	0.215	0.75	0.29
4	+1	+1	-1	-1	0.255	0.75	0.34
5	-1	-1	+1	-1	0.425	1	0.43
6	+1	-1	+1	-1	0.255	0.75	0.34
7	-1	+1	+1	-1	0.36	1	0.36
8	+1	+1	+1	-1	0.255	0.25	1.02
9	-1	-1	-1	+1	0.26	0.75	0.34
10	+1	-1	-1	+1	0.24	1	0.24
11	-1	+1	-1	+1	0.205	1	0.21
12	+1	+1	-1	+1	0.235	1	0.24
13	-1	-1	+1	+1	0.355	0.75	0.47
14	+1	-1	+1	+1	0.25	1	0.25
15	-1	+1	+1	+1	0.38	2	0.19
16	+1	+1	+1	+1	0.275	0.5	0.55
17	-2	0	0	0	0.26	2	0.13
18	+2	0	0	0	0.22	0.75	0.29
19	0	-2	0	0	0.23	0.25	0.92
20	0	+2	0	0	0.285	2.15	0.14
21	0	0	-2	0	0.1	2	0.05

Tabla 5.16 (Continuación)

Ref.	Alm	Pep	Lev	HK ₂ PO ₄	mg/ml	IC ₅₀	PAT
22	0	0	+2	0	0.52	2.08	0.26
23	0	0	0	-2	0.33	1	0.33
24	0	0	0	+2	0.14	1	0.14
25	0	0	0	0	0.235	0.75	0.31
26	0	0	0	0	0.31	1	0.31
27	0	0	0	0	0.24	0.75	0.32
28	0	0	0	0	0.285	0.75	0.38
29	0	0	0	0	0.21	0.75	0.28
30	0	0	0	0	0.265	0.75	0.35
31	0	0	0	0	0.285	1	0.29

Alm = almidón; Pep = peptona; Lev = levadura entera.

Las principales posibilidades de interrelación pueden ser:

1.- Lineales + binarias + cuadráticas

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_5x_1x_2 + a_6x_1x_3 + a_7x_1x_4 + a_8x_2x_3 + a_9x_2x_4 + a_{10}x_3x_4 + a_{11}x_1^2 + a_{12}x_2^2 + a_{13}x_3^2 + a_{14}x_4^2$$

2.- Lineales, binarias, ternarias y cuadráticas

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_5x_1x_2 + a_6x_1x_3 + a_7x_1x_4 + a_8x_2x_3 + a_9x_2x_4 + a_{10}x_3x_4 + a_{11}x_1x_2x_3 + a_{12}x_1x_2x_4 + a_{13}x_2x_3x_4 + a_{14}x_1^2 + a_{15}x_2^2 + a_{16}x_3^2 + a_{17}x_4^2$$

3.- Lineales, ternarias y cuadráticas

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_5x_1x_2x_3 + a_6x_1x_2x_4 + a_7x_2x_3x_4 + a_8x_1^2 + a_9x_2^2 + a_{10}x_3^2 + a_{11}x_4^2$$

La Tabla 5.17 resume los resultados obtenidos en cada una de las posibilidades.

Tabla 5.17.-Interrelaciones para ML1

Tipo de interrelación	Término independiente	Desviación	Regresión	Índice de Fisher	Grado de significación	Correlación múltiple (R)
1	0.32	$2.75 \cdot 10^{-2}$	$6.09 \cdot 10^{-2}$	2.21	94%	0.66
2	0.32	$2.4 \cdot 10^{-2}$	$5.56 \cdot 10^{-2}$	2.29	94.5%	0.77
3	0.35	$2.93 \cdot 10^{-2}$	$5.23 \cdot 10^{-2}$	1.79	92%	0.73

Fisher = Regresión/Desviación

La mejor relación de Fisher se dio en las interrelaciones múltiples lineales + binarias + ternarias + cuadráticas, por lo que se desarrollaron todos los demás cálculos, tal y como se refleja en la Tabla 5.18.

Tabla 5.18.- Desarrollo de la interrelación 2 para ML1

Variables	Coefficientes (b _j) *10 ⁻²
Alm (X ₁)	3.61
Pep (X ₂)	-6.86
Lev (X ₃)	7.36
Fos (X ₄)	-4.82
Alm + Pep (X ₁ X ₂)	10.34
Alm + Lev (X ₁ X ₃)	9.29
Alm + Fos (X ₁ X ₄)	2.02
Pep + Lev (X ₂ X ₃)	4.59
Pep + Fos (X ₂ X ₄)	-5.40
Lev + Fos (X ₃ X ₄)	1.52
Alm+Pep+Lev (X ₁ X ₂ X ₃)	2.46
Alm+Pep+Fos (X ₁ X ₂ X ₄)	-6.02
Alm+Lev+Fos (X ₁ X ₃ X ₄)	-2.10
Pep+Lev+Fos (X ₂ X ₃ X ₄)	-7.27
Alm ² (X ₁ ²)	-7.02
Pep ² (X ₂ ²)	7.30
Lev ² (X ₃ ²)	-2.08
Fos ² (X ₄ ²)	-7.70

Alm = almidón; Lev = levadura entera; Pep = peptona; Fos = HK₂PO₄

Resolviendo el polinomio para obtener la variable dependiente y (predicción o estimación), se obtuvieron los valores estimados.

La comparación entre resultados predecibles y reales, así como la desviación entre ellos $\text{desviación} = \text{valor real} - \text{valor estimado} / \text{real} \times 100$ (en valor absoluto), vino reflejada en la siguiente Tabla:

Tabla 5.19.- Comparación de resultados reales con predicciones

	Valores de y reales	Valores de y estimados	$\frac{\text{Estimados}-\text{Real}}{\text{Real}} \times 100$
1	0.68	0.72	6%
2	0.23	0.25	9%
3	0.29	0.18	38%
4	0.34	0.26	24%
5	0.43	0.43	0%
6	0.34	0.31	9%
7	0.36	0.26	28%
8	1.02	0.89	13%
9	0.34	0.36	6%
10	0.24	0.29	21%
11	0.21	0.13	38%
12	0.24	0.13	46%
13	0.47	0.49	4%
14	0.25	0.31	24%
15	0.19	0.06	68%
16	0.55	0.45	18%
17	0.13	0.22	69%
18	0.29	0.36	24%
19	0.92	0.75	18%
20	0.14	0.47	>100%
21	0.05	0.09	80%

	Valores de y reales	Valores de y estimados	$\frac{\text{Estimados-Real}}{\text{Real}} \times 100$
22	0.26	0.38	46%
23	0.33	0.41	24%
24	0.14	0.22	57%
25	0.31	0.32	3%
26	0.31	0.32	3%
27	0.32	0.32	0%
28	0.38	0.32	16%
29	0.28	0.32	14%
30	0.35	0.32	9%
31	0.29	0.32	10%

5.2.3.2.- Cepa ACM2

Selección de variables: glucosa; levadura; peptona y carbonato cálcico.

Suplementación en todos los medios de almidón 5 g/l, HK_2PO_4 0.55 g/l, sales 10g/l.

En este caso se seleccionó el valor (0,0,0,0) como glucosa 30 g/l, peptona 3 g/l, levadura 10 g/l y carbonatos 4 g/l. El resto de valores viene reflejado en la Tabla 5.20.

Tabla 5.20.- Concentraciones de nutrientes empleadas para la cepa ACM2

lucosa	Peptona	Levadura	CaCO_3	Codificación
1	1	1	0	-2
15	2	5	2	-1
30	3	10	4	0
45	4	15	6	+1
60	5	20	8	+2

Todos los valores en g/l

Se utilizó la misma matriz que en el caso anterior, pero con las variables propias.

Tabla 5.21.- Composición de los medios de fermentación empleados y resultados obtenidos para la cepa ACM2 utilizando el diseño de Box-Wilson para estudios de correlación múltiple.

Ref.	Glu	Pep	Lev	CaCO_3	mg/ml	IC_{50}	PAT
1	-1	-1	-1	-1	0.25	2.25	0.111
2	+1	-1	-1	-1	0.22	11	0.02
3	-1	+1	-1	-1	0.26	2.5	0.104
4	+1	+1	-1	-1	0.215	2.25	0.096
5	-1	-1	+1	-1	0.47	3.25	0.145
6	+1	-1	+1	-1	0.455	2.5	0.182
7	-1	+1	+1	-1	0.46	5.5	0.109
8	+1	+1	+1	-1	0.495	1.1	0.45
9	-1	-1	-1	+1	0.28	0.9	0.311
10	+1	-1	-1	+1	0.24	1	0.24
11	-1	+1	-1	+1	0.3	22	0.014
12	+1	+1	-1	+1	0.23	20	0.012
13	-1	-1	+1	+1	0.42	20	0.021
14	+1	-1	+1	+1	0.415	22	0.019
15	-1	+1	+1	+1	0.26	12.25	0.021
16	+1	+1	+1	+1	0.455	10	0.046
17	-2	0	0	0	0.36	24	0.015
18	+2	0	0	0	0.335	14	0.024

Tabla 5.21 (Continuación)

Ref.	Glu	Pep	Lev	CaCO ₃	mg/ml	IC ₅₀	PAT
19	0	-2	0	0	0.34	18	0.019
20	0	+2	0	0	0.425	18	0.024
21	0	0	-2	0	0.145	7.5	0.019
22	0	0	+2	0	0.525	20	0.026
23	0	0	0	-2	0.355	6.75	0.053
24	0	0	0	+2	0.345	12	0.029
25	0	0	0	0	0.33	11	0.03
26	0	0	0	0	0.315	10	0.032
27	0	0	0	0	0.35	10	0.035
28	0	0	0	0	0.305	12	0.025
29	0	0	0	0	0.345	12	0.029
30	0	0	0	0	0.295	11	0.027
31	0	0	0	0	0.33	14	0.024

Glu = glucosa; Pep = peptona; Lev = levadura

Se estudiaron los tres supuestos más lógicos de posibles interrelaciones con las mismas ecuaciones descritas en el apartado anterior

- 1.- Lineales + binarias + cuadráticas
- 2.- Lineales + binarias + ternarias + cuadráticas
- 3.- Lineales + ternarias + cuadráticas

Tabla 5.22.- Interrelaciones de la cepa ACM2

Tipo de interrelación	Término independiente	Desviación	Regresión	Índice de Fisher ^a	Grado de significación	Correlación múltiple (R)
1	$2.86 \cdot 10^{-2}$	$5.57 \cdot 10^{-3}$	$1.50 \cdot 10^{-2}$	2.70	97%	0.702
2	$2.86 \cdot 10^{-2}$	$4.28 \cdot 10^{-3}$	$1.38 \cdot 10^{-2}$	3.21	98%	0.828
3	$2.89 \cdot 10^{-2}$	$4.39 \cdot 10^{-3}$	$1.37 \cdot 10^{-2}$	3.12	98.5%	0.811

^a Fisher = Regresión/Desviación.

La mejor relación de Fisher se dio, como en el caso anterior, en el tipo 2, por lo que se desarrollaron todos los demás cálculos a partir de esa correlación.

Tabla 5.23.- Desarrollo de la interrelación de tipo 2

Variables	Coefficientes (b _x) * 10 ⁻²
Glu (X ₁)	-0.46
Pep (X ₂)	0.71
Leva (X ₃)	-1.08
Carb (X ₄)	-3.32
Glu + Pep (X ₁ X ₂)	5.26
Glu + Lev (X ₁ X ₃)	1.34
Glu + Carb (X ₁ X ₄)	-3.41
Pep + Lev (X ₂ X ₃)	6.71
Pep + Carb (X ₂ X ₄)	-3.64
Lev + Carb (X ₃ X ₄)	-7.76
Glu+Pep+Lev (X ₁ X ₂ X ₃)	3.36
Glu+Pep+Carb (X ₁ X ₂ X ₄)	-0.46
Glu+Lev+Carb (X ₁ X ₃ X ₄)	-3.74
Pep+Lev+Carb (X ₂ X ₃ X ₄)	3.79
Glu ² (X ₁ ²)	0.94
Pep ² (X ₂ ²)	0.99
Lev ² (X ₃ ²)	1.01
Carb ² (X ₄ ²)	1.47

Glu = glucosa; Lev = levadura entera; Pep = peptona; Carb = CaCO₃

Resolviendo como en el caso anterior el polinomio para obtener la variable dependiente y (predicción o estimación), se compararon dichos datos Tabla 5.24

Tabla 5.24.- Comparación de resultados reales y predicciones de la correlación 2

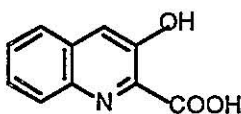
	Valores de y reales	Valores de y estimados	Diferencia
1	0.111	0.070	37%
2	0.020	0.020	0%
3	0.104	0.051	51%
4	0.096	0.056	42%
5	0.145	0.111	23%
6	0.182	0.090	50%
7	0.109	0.074	35%
8	0.450	0.420	7%
9	0.311	0.292	6%
10	0.240	0.233	5%
11	0.014	0.006	57%
12	0.012	0.006	50%
13	0.021	0.020	5%
14	0.019	0.009	53%
15	0.021	0.008	62%
16	0.046	0.046	0%
17	0.015	0.076	>100%
18	0.024	0.057	>100%
19	0.019	0.054	>100%
20	0.024	0.083	>100%
21	0.019	0.091	>100%
22	0.026	0.048	85%
23	0.053	0.154	>100%
24	0.029	0.021	28%
25	0.030	0.029	3%
26	0.032	0.029	9%
27	0.035	0.029	17%
28	0.025	0.029	16%
29	0.029	0.029	0%
30	0.027	0.029	7%
31	0.024	0.029	21%

5.2.4.- Efecto de la adición de análogos del ácido 3-hidroxi-2-quinolincarboxílico y aminoácidos sobre la productividad de las cepas productoras de tiocoralinas

Para realizar dicho estudio, se utilizó el medio MB, en el que los niveles de actividad antitumoral eran semejantes en las cepas ML1 y ACM2. Al realizar varios muestreos de cada matraz, se emplearon volúmenes mayores (matraces Erlenmeyer de 2 litros con 250 ml de medio. Se valoró la cantidad de extracto obtenido, así como su actividad antitumoral frente a leucemia de ratón P388 para establecer las potencias antitumorales.

5.2.4.1.- Adición de análogos de grupos cromóforos

El primer experimento se realizó únicamente con la cepa ML1, valorándose la PAT a las 144 h. Las adiciones se realizaron añadiendo los productos como polvo seco a las 48 h de la inoculación hasta conseguir una concentración final de 2.5 mM.

Grupo cromóforo integrante de la molécula de tiocoralinas

ácido 3-Hidroxiquinolín-2-carboxílico

Se seleccionaron compuestos comerciales análogos a la estructura anterior, fundamentalmente derivados quinoxalínicos y quináldicos. En la Tabla 5.25 se especifican los grupos empleados.

Tabla 5.25.- Análogos empleados en adiciones a caldos de ML1 a las 48h de la inoculación

Ref.	Estructura	Nombre	Ref.	Estructura	Nombre
ANA-1		ácido 4-Hidroxiquinolín-2-carboxílico	ANA-5		ácido 4,8-dihidroxiquinolín-2-carboxílico
ANA-2		ácido 3-Hidroxi-2-quinoxalín carboxílico	ANA-6		ácido Cromón-2-carboxílico
ANA-3		ácido 4-Metoxi-2-quinolín carboxílico	ANA-7		ácido Coumarín-3-carboxílico
ANA-4		ácido 7-Metoxi-2-benzofurán carboxílico			

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla 5.26.

Tabla 5.26.- Resultados obtenidos por la adición de análogos a cultivos de ML1

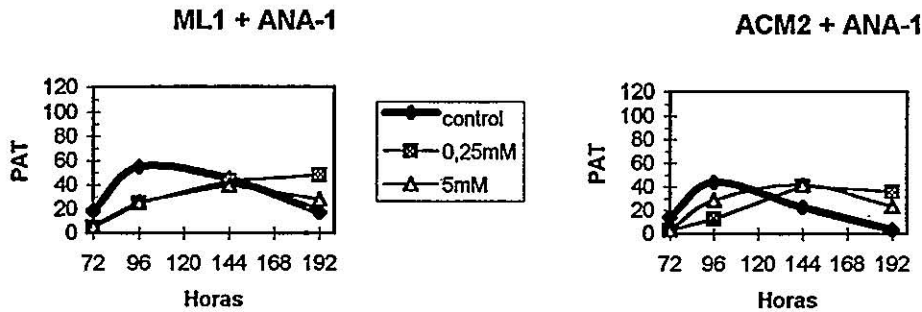
Ref.	mg/l	mmh ¹	IC ₅₀ (μg/ml)	PAT	% ²
CONTROL	110	6.5	2.5	44	100
ANA-1	120	6.5	2.5	48	109
ANA-2	135	7.5	1.7	79.4	180
ANA-3	115	-	9.8	11.7	27
ANA-4	135	6.5	3	45	102
ANA-5	105	-	10	10.5	24
ANA-6	95	-	7.5	12.7	29
ANA-7	100	-	7.5	13.3	30

¹ mm de inhibición sobre *B. subtilis* de 20μg extracto/disco ² % de productividad referida al 100% del control Análogos empleados: ANA-1 (ác.4-hidroxiquinolín-2-carboxílico) ANA-2 (ác.3-hidroxi-2-quinoxalín carboxílico) ANA-3 (ác.4-metoxi-2-quinolín carboxílico) ANA-4 (ác.7-metoxi-2-benzofurán carboxílico) ANA-5 (ác.4,8-dihidroxiquinolín-2-carboxílico) ANA-6 (ác.cromón-2-carboxílico) ANA-7 (ác.coumarín-3-carboxílico)

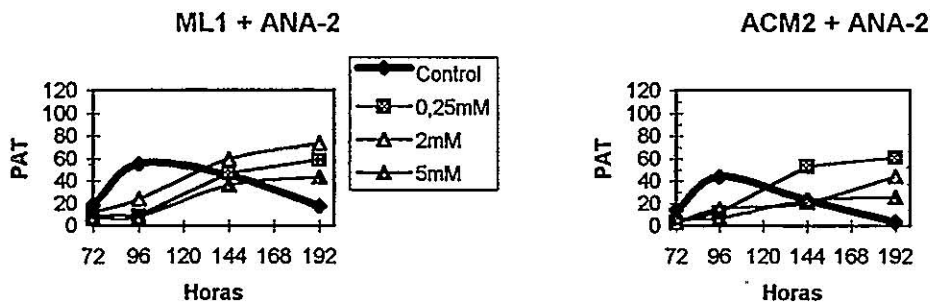
A la vista de los resultados anteriores, se seleccionaron los análogos ANA-1 y ANA-2 al aparentar cierta mejoría de los valores de potencia antitumoral. Se volvieron a añadir

a las 48 h de la inoculación, pero a diferentes concentraciones finales y sobre las dos cepas de tiocoralinas, tal y como se detalla en Métodos. Las valoraciones se realizaron a 72, 96, 144 y 192 h de la inoculación. Los resultados se representan en las gráficas 5.9 a 5.12.

Gráficas 5.9 y 5.10.- Efecto de la adición de ANA-1 a 48 h sobre las PAT



Gráficas 5.11 y 5.12.- Efecto de la adición de ANA-2 a 48 h sobre las PAT



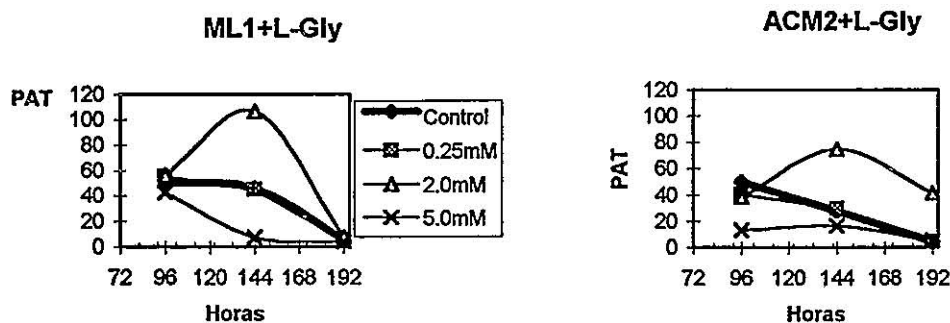
5.2.4.2.- Adición de aminoácidos

Se seleccionaron los aminoácidos L-cisteína y L-glicina por ser integrantes de la estructura de las tiocoralinas y L-tirosina y L-triptófano por la posible regulación que presentan en procesos del metabolismo secundario en algunos microorganismos.

Los diferentes aminoácidos se adicionaron a las 48 h de la inoculación en soluciones acuosas esterilizadas (ver Métodos) hasta alcanzar unas concentraciones finales de 0.25 mM, 2 mM y 5 mM. Los muestreos se realizaron a 96, 144 y 192 h, excepto para L-cisteína que también se realizó a las 72h. Los resultados quedan reflejados en las gráficas 5.13 a 5.20.

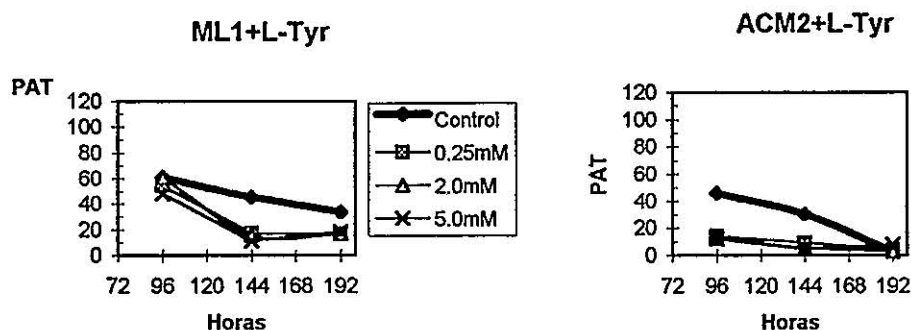
Adición de L-glicina:

Gráficas 5.13 y 5.14: Efecto sobre la PAT de adiciones de L-glicina a 48h de la inoculación



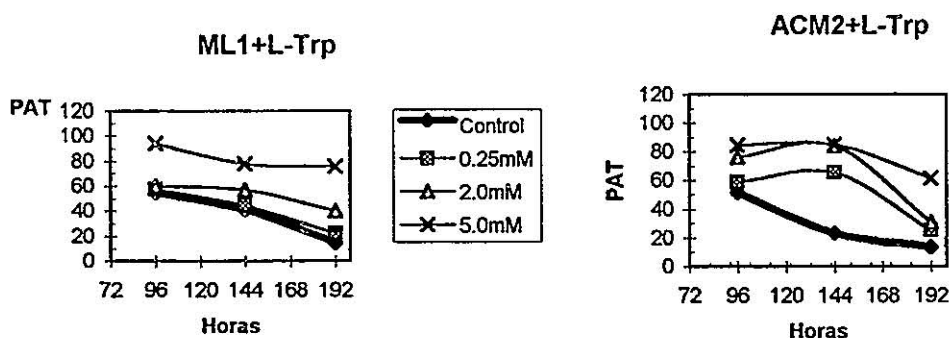
Adición de L-tirosina

Gráficas 5.15 y 5.16: Efecto sobre PAT de adiciones de L-tirosina a 48h de la inoculación



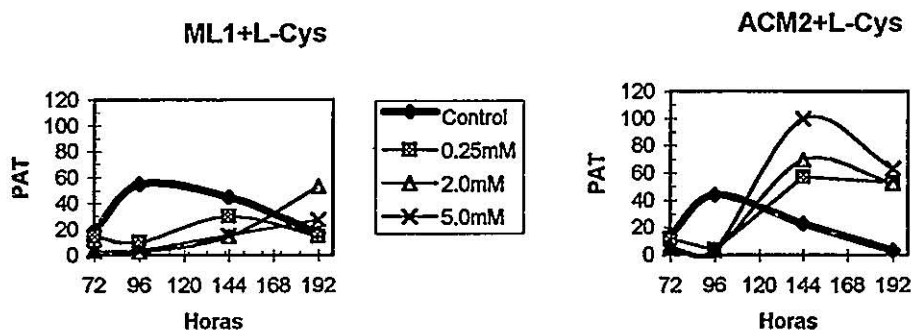
Adición de L-triptófano

Gráficas 5.17 y 5.18.- Efecto sobre PAT de adiciones de L-triptófano a 48h de la inoculación



Adición de L-cisteína

Gráficas 5.19 y 5.20.- Efecto sobre PAT de adiciones de L-cisteína a 48h de la inoculación



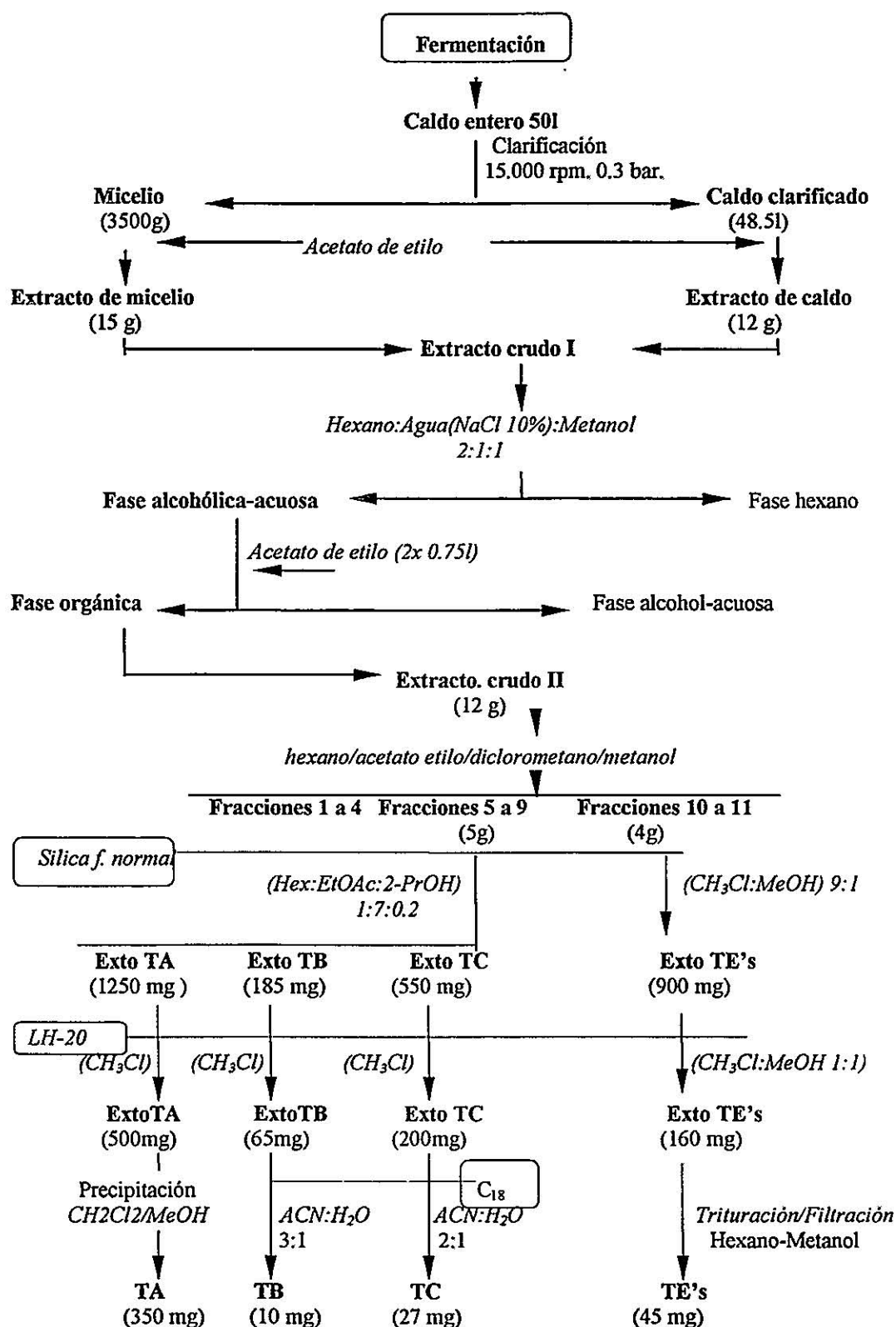
5.3.- OBTENCIÓN DE NUEVAS TIOCORALINAS

Una vez obtenidas las condiciones de fermentación adecuadas, se procedió al estudio de las condiciones de extracción de los caldos y purificación de los compuestos, por medio de la aplicación de técnicas cromatográficas, acopladas a la detección de compuestos con actividad biológica.

5.3.1.- Extracción y purificación de tiocoralinas

Se realizó la extracción del caldo clarificado y del micelio por separado, uniéndose posteriormente. El disolvente empleado fue acetato de etilo por su inmiscibilidad con el agua y por su adecuada polaridad y volatilidad, lo que lo hace idóneo para su recuperación después de la destilación.

El extracto obtenido al evaporar las fases acuosas fue extraído de la mezcla hexano:NaCl:MeOH con acetato de etilo. Posteriormente, se hicieron particiones con hexano: acetato de etilo: diclorometano:metanol, separándose fracciones enriquecidas en tiocoralinas A, B y C del compuesto más polar, E. En los siguientes procesos se utilizaron diversas técnicas cromatográficas en columna, realizando el seguimiento de fracciones por TLC y bioautografía sobre *Bacillus subtilis*. El Esquema 5.1 representa la extracción y purificación completa de las nuevas tiocoralinas.

Esquema 5.1. Extracción / purificación de tiocoralinas A, B, C y E

Una vez comprobada por HPLC la ausencia de impurezas, los nuevos productos fueron sometidos a técnicas de elucidación estructural: espectrometría de masas (FAB+) y ¹H y ¹³C RMN (ver espectros en Anexos).

5.3.2.- Estructuras químicas. Perfiles cromatográficos y solubilidades

La estructura de la tiocoralina A (TA) fue totalmente elucidada por Pérez-Baz (*Pérez-Baz et al., 1997*) (Fig. 5.1). A partir de los datos de masas y ^{13}C RMN, se dedujo la estructura de la tiocoralina B (TB). La estructura de tiocoralina C (TC) debe ser muy similar a la representada en la Figura 5.1, a falta la total confirmación.

Fig. 5.1 Estructuras de las tiocoralinas

TA	TB	TC
Compuesto	Fórmula estructural	Ion Molecular (M+H)
Tiocoralina A (TA)	$\text{C}_{48}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_6$	1.157
Tiocoralina B (TB)	$\text{C}_{48}\text{H}_{58}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_6$	1.159
Tiocoralina C (TC)	$\text{C}_{46}\text{H}_{48}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}_4$	1.061
Tiocoralina E (TE)	Sin determinar	1.063

La coincidencia entre TC y el compuestos BE-22179 (*Okada et al., 1994*) es exacta en la comparación de espectros de resonancia ^1H RMN, masas, movilidad cromatográfica en capa fina y actividades biológicas. Sin embargo, el análisis del espectro ^{13}C RMN presenta ciertas dudas, es por ello que se realizó la acetilación del compuesto para clarificarlo. (Ver Anexos).

Las características cromatográficas de éstos compuestos se reflejan en las Tablas 5.27 y 5.28.

La cromatografía en capa fina se realizó sobre placas de silicagel G60 (Merck). Se tomaron los R_f como el cociente entre la distancia recorrida por el compuesto y la recorrida por el frente.

Tabla 5.27.- R_f de tiocoralinas en diferentes sistemas de elución

Compuestos	I	II	III	IV
TA	0.55	0.70	0.81	0.65
TB	0.51	0.54	0.76	0.57
TC	0.43	0.40	0.52	0.55
TE	0	0	0.10	0.44

Fases móviles: I (EtOAc:CH₃:AcOH 10:5:0.15); II (EtOAc:CH₃Cl 1:4); III (Hex:EtOAc:2-PrOH 1:7:0.2); IV (CH₃Cl:MeOH 9/1).

Al carecer de patrón interno, no se pudieron determinar los grados de pureza de cada compuesto, aunque se estimaron como suficientes para su identificación y determinación de actividades biológicas (cromatogramas HPLC en Anexos).

Empleando el sistema cromatográfico de alta presión especificado en Métodos (Columna: Zorbax SB C₁₈. 3.5µm. 150x4.6mm F.móvil: Gradiente AcN: H₂O (40% → 90% en 20'. Flujo: 1.5ml/min. Detección UV₂₅₄ ó UV₃₆₀) se obtuvieron los siguientes tiempos de retención:

TA : 16.5 min.; TB: 15.8 min.; TC: 13.4 min.; TE : 9.5 min.

Sin embargo, empleando el sistema de HPLC inicial de visualización de TA (Pérez-Baz *et al.*, 1997) se produce un solapamiento entre los compuestos TA, TB y TC (comunicación personal Pérez-Baz, Mayo 1998)

La escasa solubilidad en medios acuosos y alcohólicos de los compuestos quinoxalínicos y quinolínicos, y los cambios conformacionales existentes en disolución (Alfredson *et al.*, 1990; Alfredson *et al.*, 1991), quedó reflejada al realizar el espectro de solubilidades por la observación directa mediante lupa binocular de la desaparición de partículas al enfrentarse a diferentes disolventes. La Tabla 5.28 resume dicha experimentación.

Tabla 5.28.- Espectro de solubilidades de tiocoralinas

	H ₂ O	Hex	EtOH	MeOH	AcN	EtOAc	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ Cl	DMSO
TA	--	--	--	-	+	+	++	++	++
TB	--	--	--	-	+	+	++	++	++
TC	--	--	--	-	+	+	++	++	++
TE	--	--	--	-	-	+	++	++	++

-- Insoluble. - Muy poco soluble. 0+ Poco soluble. ++ Muy soluble

5.4.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE TIOCORALINAS Y EQUINOMICINA

5.4.1.- Inhibición bacteriana en medio sólido

Para comprobar la difusión de los compuestos en el agar, se realizó la lectura de los halos de inhibición sobre dos microorganismos Gram positivos y otros dos Gram negativos. Los microorganismos se prepararon tal y como quedó indicado en Métodos. La incubación de las placas de las bacterias a ensayar con los discos de muestra, se realizó a 35°C durante 12h. Los resultados de las medidas (en mm) de los diámetros de los halos de incubación quedaron reflejados en la Tabla 5.29.

Tabla 5.29. Lectura de halos de inhibición sobre medio sólido

Compuesto	Muestras [µg/disco]	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
TA	20	-	12	-	-
	2	-	11	-	-
	0.2	-	10	-	-
	0.02	-	8	-	-
	0.01	-	7	-	-
	0.005	-	MIC	-	-
TB	20	-	10	-	-
	2	-	9.5	-	-
	0.2	-	9	-	-
	0.02	-	7	-	-
	0.01	-	MIC	-	-
	0.005	-	MIC	-	-
TC	20	11.5	13	-	-
	2	10	12	-	-
	0.2	8	10	-	-
	0.02	MIC	8	-	-
	0.01	-	7	-	-
	0.005	-	MIC	-	-
Equinomicina	20	28	24	8	-
	2	23	20	-	-
	0.2	20.5	16.5	-	-
	0.02	14.5	11.5	-	-
	0.002	9	MIC	-	-
	0.001	MIC	-	-	-

Discos de 6 mm de diámetro. Valores de inhibición: diámetro del halo de inhibición en mm.

MIC=6.5 mm.

5.4.2.- Determinación de las MIC sobre medio líquido

Para la cuantificación de la MIC (mínima cantidad de producto que inhibe el crecimiento de microorganismos), se empleó el método de dilución en placa microtiter. La incubación se realizó a 30°C durante 12 h y la lectura de absorbancia se realizó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm (ver Métodos). La tabla 5.30 muestra los valores obtenidos por las tiocoralinas, equinomicina y estreptomina como control.

Tabla 5.30.- Lectura de MIC en µg/ml

Compuesto	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027
TA	32	0.015	0.25	>100	>100
TB	32	0.125	0.25	>100	>100
TC	4	0.0007	0.007	>100	>100
TE	64	0.125	0.5	>100	>100
Equinomicina	<0.125	0.0003	0.015	2	>100
Estreptomina	0.25	nd	0.5	<0.125	1.5

nd: no determinado

5.5.-ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VITRO* DE TIOCORALINAS Y EQUINOMICINA

Se determinó la actividad antitumoral *in vitro* frente a cultivos de células inmortalizadas, según las condiciones descritas en Métodos. La determinación de los valores de IC₅₀ se basó en el conocimiento de la concentración que inhibió el crecimiento del 50% de las células. Los valores del efecto antitumoral quedaron reflejados en la Tabla 5.31. El control de toxicidad *in vitro* se realizó sobre una línea celular inmortalizada, no tumoral.

Tabla 5.31.- Determinación de IC₅₀ (mM) de tiocoralinas y equinomicina

Ref.	P-388	A-549	HT-29	MEL-28	No tumoral
TA	1.73*10 ⁻³	1.73*10 ⁻³	1.73*10 ⁻³	1.73*10 ⁻³	8.65*10 ⁻³
TB	4.32*10 ⁻³	2.2*10 ⁻³	2.2*10 ⁻³	2.2*10 ⁻³	8.64*10 ⁻³
TC ¹	1.89*10 ⁻³	1.89*10 ⁻³	1.89*10 ⁻³	1.89*10 ⁻³	9.43*10 ⁻³
TE	18.8*10 ⁻³	23.5*10 ⁻³	23.5*10 ⁻³	23.5*10 ⁻³	94.1*10 ⁻³
Echinomicin	A1.82*10 ⁻³	0.45*10 ⁻³	0.45*10 ⁻³	0.18*10 ⁻³	1.82*10 ⁻³

Valores de IC₅₀ en mM

¹ Datos bibliográficos (Yoshinari *et al.* 1994) BE-22179 (=TC?) IC₅₀ en P-388: 2.82*10⁻³mM

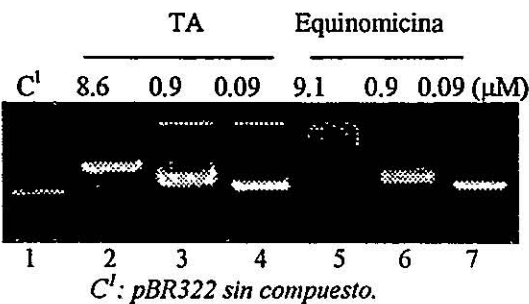
5.6.- MECANISMO DE ACCIÓN DE TIOCORALINAS Y EQUINOMICINA

Se pretendió conocer el mecanismo de unión al plásmido pBR322, deduciendo la fuerza de unión, la reversibilidad y el posible desplazamiento de la tiocoralina y equinomicina al entrar en contacto con un intercalador no específico como el bromuro de etidio. Para descartar posibles roturas del DNA, así como posibles uniones covalentes a las bases nitrogenadas, se procedió a la extracción y precipitación del plásmido después de haber estado en contacto con las drogas, con o sin incubación con topoisomerasa II.

5.6.1.- Estudios de unión DNA-tiocoralinas

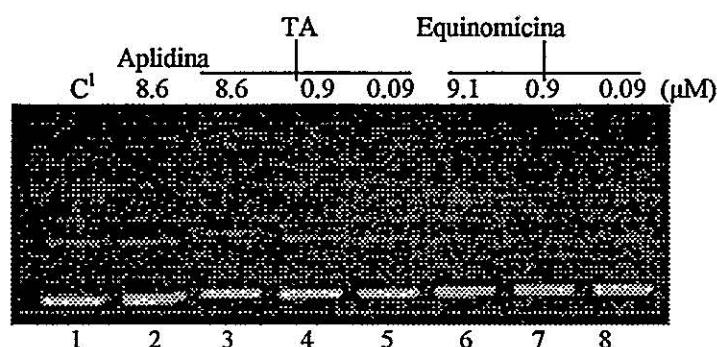
- Se procedió a la incubación, de tiocoralina A y equinomicina con pBR322, visualizando posteriormente la movilidad electroforética del plásmido. Una vez finalizada la electroforesis se tiñó el gel con bromuro de etidio. (Figura 5.2)

Figura 5.2.- Incubación de pBR322 (200ng) con tiocoralina A (calles 2 a 4) y equinomicina (5 a 7). Tinción con bromuro de etidio después de realizar la electroforesis sobre gel de agarosa 1% .



- Se procedió a realizar la incubación en las mismas condiciones que en el caso anterior, excepto que en esta experimentación, se añadió el BrEt al gel y al tampón de electroforesis antes de cargar las muestras.

Fig. 5.3:- Incubación de pBR322 (200ng) con Aplidina¹ (2), tiocoralina A (3 a 5) y equinomicina (6 a 8). Tinción con bromuro de etidio al gel antes de realizar la electroforesis sobre gel de agarosa 1%



- Se procedió a la extracción y precipitación del plásmido después de su incubación con los productos (calles 7 y 8). Se procedió a teñir el gel después de haber sido realizada la electroforesis (Figura 5.4)

Fig. 5.4.-Comparación de la movilidad del plásmido pBR322 sin producto (1) y con tiocoralina A (2)

1: pBR322 extraído 2: pBR322 + TA (8.6μM) extraído

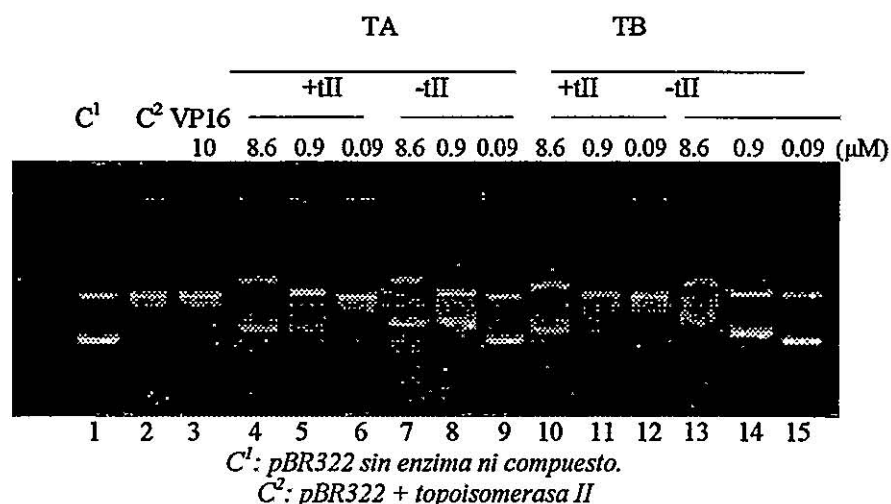


5.6.2.- Efecto sobre Topoisomerasa II

- Se incubaron tiocoralinas (TA y TB) con pBR322 en presencia y ausencia de topoisomerasa II (*Drosophila melanogaster*) tal y como se detalla en Métodos. Se desarrolló la electroforesis sin BrEt. Figura 5.5.

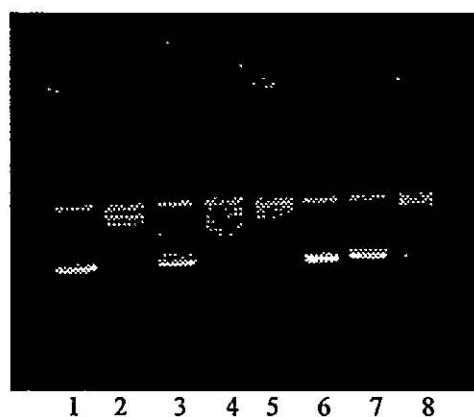
¹ Péptido compuesto por 7 restos aminoácídicos, con peso molecular similar a Tiocoralina A, con elevada actividad antitumoral, desarrollado por PharmaMar

Fig. 5.5.- Electroforesis sobre gel de agarosa 1% con tinción con bromuro de etidio después de finalizar la misma. Se utilizó Aplidina como control negativo. Tiocoralina A con topo II (calles 4 a 6) y sin topoII (7 a 9). Tiocoralina B con topo II (10 a 12) y sin topo II (13 a 15)



Se incubaron TA y echinomycin con pBR322 en presencia de topoisomerasa II de *Drosophila melanogaster*. Se realizó la extracción y precipitación del plásmido tal y como se detalla en Métodos. La electroforesis fue llevada a cabo sin BrEt. Foto 5.5

Foto 5.5.- Electroforesis sobre gel de agarosa 1% con tinción con bromuro de etidio después de finalizar la misma.



- 1.- pBR322 (0.15 μ g)
- 2.- pBR322 (0.15 μ g) + topoisomerasa II (3U)
- 3.- pBR322 (0.15 μ g) + topoisomerasa II (3U) + tiocoralina A (8.6 μ M)
- 4.- pBR322 (0.15 μ g) + topoisomerasa II (3U) + tiocoralina A (0.9 μ M)
- 5.- pBR322 (0.15 μ g) + topoisomerasa II (3U) + tiocoralina A (0.01 μ M)
- 6.- pBR322 (0.15 μ g) + topoisomerasa II (3U) + equinomicina (9 μ M)
- 7.- pBR322 (0.15 μ g) + topoisomerasa II (3U) + equinomicina (0.9 μ M)
- 8.- pBR322 (0.15 μ g) + topoisomerasa II (3U) + equinomicina (0.01 μ M)

6.- DISCUSIÓN

6.1.- COMPARACIÓN TAXONÓMICA DE CEPAS PRODUCTORAS DE TIOCORALINAS, SANDRAMICINA Y TRIOSTINA.

Las cepas bacterianas productoras de compuestos quinoxalínicos y derivados quinolínicos no forman un grupo taxonómico relacionado, abarcando muy distintos géneros de actinomicetos (Tabla 1.1). Lo mismo ocurre con los microorganismos productores de los derivados de diyneno y los nucleósidos antimetabolitos (Foye, 1995).

Por los estudios comparativos realizados a dos cepas de *Micromonospora sp.* (ML1 y ACM2, productoras de tiocoralinas), *Nocardioides sp.* (sandramicina) y *Streptomyces triostinicus* (trioquinas), basados en consumo de determinadas fuentes de carbono, se desprende que el comportamiento metabólico es muy heterogéneo entre las cuatro cepas, coincidiendo en la utilización de glucosa, sacarosa y xilosa (Tabla 5.1) y en la ausencia de consumo de adonitol, inositol, rafinosa, ramnosa y ribosa. La variabilidad es alta al analizar los consumos individuales del resto de azúcares.

Las dos cepas productoras de tiocoralinas son actinomicetos que pertenecen al género *Micromonospora* (Espliego, 1996). Producen ureasa, catalasa y α -glucosidasa, presentando mayor tolerancia al crecimiento en medio halófilo (fueron aisladas de hábitat marino) si bien pueden hacerlo en ausencia de NaCl (Gráfica 5.1). De ellas, *Micromonospora sp.* ML1 coincide en la producción de fosfatasa con *Streptomyces triostinicus*. La presencia de α -glucosidasa y catalasa es común a las cuatro cepas, así como la ausencia en el consumo de esculina y arginina, producción de acetoina e hidrólisis de piroglutamato.

Los espectros de sensibilidad frente a antibióticos demuestran, al agrupar los antibióticos empleados por grupos dependientes de mecanismo de acción (Mensa et al. 1992; Busquets, 1980), que *Streptomyces triostinicus* fue más resistente que las demás cepas a antibióticos que actúan inhibiendo la formación de pared impidiendo la síntesis de peptidoglicanos (penicilinas y cefalosporinas), así como también lo fue frente a antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de ácido fólico (sulfonamidas y diaminopirimidinas). Todas las cepas fueron sensibles a los antibióticos que conjugan tres efectos (polipéptidos y glicopéptidos): inhibición de la formación de pared (previa a la actuación de los betalactámicos), alteración de la permeabilidad de membrana e inhibición de la síntesis proteica. Igualmente, son susceptibles a inhibidores de síntesis proteica por unión a subunidades ribosomales 30s (tetraciclinas) ó 30s y 50s (aminoglicósidos). Sin embargo, presentaron cierta resistencia a los que sólo se unen a la subunidad ribosomal 50s (lincosamina y macrólidos). Las cepas ML1 y ACM2 exhibieron mayor sensibilidad a inhibidores de DNA-girasa (similar a topoisomerasas en eucariotas) y a inhibidores de la RNA polimerasa (rifamicinas), siendo más resistentes, lógicamente, a sus propios productos (tiocoralinas)

6.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE NUTRIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE TIOCORALINAS, SANDRAMICINA Y TRIOSTINAS

Se utilizó la técnica de Plackett y Burman (*Stowe y Mayer*, 1966) para valorar la incidencia de cada nutriente sobre el efecto causado en el crecimiento miceliar y la productividad obtenida. Si ninguna variable alcanza un grado de confianza significativo o muchas de ellas lo hacen, este método no habrá sido de ayuda, ya que las variables seleccionadas, o el rango de concentraciones empleado no ha sido el óptimo para hacer variar significativamente los resultados.

La selección de los tres efectos (Tablas 5.4 y 5.9) menores como variables placebo (E_d), sirvió como estimación del error estándar del sistema (ruido de fondo), que fue en general bajo, tanto en las valoraciones sobre el crecimiento como en la producción, teniendo en cuenta el amplio rango de resultados obtenido.

Crecimiento miceliar

La glucosa mostró un efecto nulo sobre el crecimiento (Tabla 5.6) a 96 h y 144 h en todas las cepas, excepto en *S. triostinicus* que tuvo coeficientes de confianza del 94% y 97% respectivamente. El almidón, fuente de carbono más lentamente agotable, mostró un grado de significación muy alto en todas las cepas, especialmente en ML1 y *Nocardioides* (superior al 99%). Un mayor coeficiente de confianza a 144 h que a 96 h, indicaría que los niveles de este polisacárido en el medio de cultivo a los 6 días de incubación son útiles para el aumento de biomasa. Similar efecto positivo se comprobó con la levadura, superando el 97% en todos los casos, aunque las productoras de tiocoralinas se mostraron más afectadas a 144 h que a 96 h. Esto indica un posible agotamiento de esa fuente nitrogenada, cosa que no ocurrió con los otros dos organismos.

El extracto de malta resultó tener un efecto nulo en todos los casos. La peptona fue muy variable, mientras que en *S. triostinicus* influyó negativamente (-95% significación), fue muy positiva para *Nocardioides* (99.2%) y tuvo un efecto moderado en el crecimiento de las cepas productoras de tiocoralinas. Contrarios resultados se dieron con HK_2PO_4 siendo negativo para ML1, pero no tuvo significación para los demás microorganismos. El CaCO_3 fue placebo para todos, excepto para ACM2, en cuyo caso influyó negativamente sobre la producción de biomasa, lo que a priori no era de esperar al ser considerado como elemento con capacidad de tamponamiento de pH y sustrato para fijación de micelio.

Producción (Tablas 5.7 a 5.10)

Se obtuvieron resultados de alta significación en *S. triostinicus*, donde tanto glucosa, como almidón y levadura presentaron un coeficiente de confianza superior al 99.9%. Las cepas productoras de tiocoralinas coincidieron en efectos nulos en la potencia de actividad antitumoral (PAT) con extracto de malta, moderados con peptona (94.5%) y positivos con levadura (96.5%). El CaCO_3 fue negativo (-94%) en ACM2 y nulo en ML1; sin embargo,

la glucosa fue el mejor estimulante de la producción para ACM2 y placebo para ML1, a la inversa que lo que ocurre en estas cepas con almidón.

La elección de las variables, o el rango de concentraciones utilizado, no fue el idóneo para *Nocardioides sp.* ya que sólo la glucosa mostró algún efecto, mostrando el resto de nutrientes significaciones nulas.

Analizando los resultados obtenidos para la cepa ACM2, se observa que la glucosa no causaba efecto significativo en el crecimiento, pero lo tuvo máximo para la producción, al contrario que el almidón, que estimulaba el crecimiento a 144h, pero no tenía influencia en la producción de tiocoralinas. La producción de sandramicina no se ve influenciada por peptona y PO_4HK_2 , mientras que ambos compuestos tuvieron notable influencia en el crecimiento del microorganismo productor. Estos datos indicaron que las mismas variables pueden causar efectos diferentes en la estimulación del crecimiento y la producción.

Los diferentes resultados de la influencia de los nutrientes sobre producción de tiocoralinas coinciden con lo descrito por Monaghan y Koupal en 1989. Dichos autores sometieron a tres cepas diferentes, productoras de tienamicina a este estudio, interpretando las diferencias observadas como la posibilidad de diferentes vías de regulación en la biosíntesis del mismo metabolito secundario, sin descartar otras posibilidades como diferentes permeabilidades de membrana a ciertos nutrientes o variaciones de saturación enzimática a pesar de la similitud taxonómica de los microorganismos productores. También se observaron diferentes efectos entre nutrientes de diferentes cepas de *Saccharopolyspora spinosa* productoras de macrólidos (Sroebel *et al.*, 1993), concluyendo que podrían ser debidas a diferencias entre las fisiologías básicas como diferentes tasas de utilización de glucosa o distintos niveles de actividad proteolítica.

6.3.- OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TIOCORALINAS Y ESTUDIO DE LAS INTERRELACIONES ENTRE NUTRIENTES.

Una vez medidos los efectos de cada nutriente sobre la producción de tiocoralinas, se diseñó la composición del medio de cultivo más adecuado para cada cepa productora, según la técnica descrita por Hendrix en 1980.

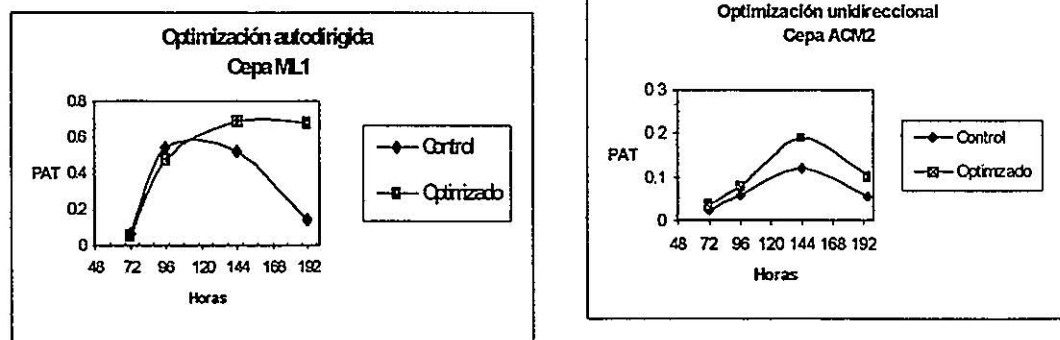
Después de realizar cuatro descartes completos de los seis medios con menor producción de cada serie de dieciséis para cada cepa, se formuló un medio mejorado de producción de la siguiente manera:

- Para cada compuesto se calculo su concentración media en cada proceso de mejora y estos valores se ajustaron mediante una función logarítmica. Dicha función se eligió al ser de tipo asintótico y por lo tanto era esperable que se ajustase mejor a efectos de saturación. Las composiciones teóricas de los medios que fueron siendo optimizados.
- Una vez obtenidas las curvas de ajuste, se extrapoló al valor que cada variable presentaría en un quinto proceso de mejora. De esta manera se calcularon las concentraciones de este medio mejorado

Las evoluciones de las concentraciones de cada nutriente al ir optimizándolas, (Gráficas 5.2 a 5.8) tuvieron su concordancia con los resultados esperados por la realización de la técnica de Plackett y Burman para la producción de tiocoralinas. En los valores que resultaron no tener significación (placebos), su regresión fue baja, mientras los que mostraron mayor efecto sobre la producción, bien al ir aumentando o disminuyendo sus concentraciones para alcanzar las mejores PAT, el ajuste fue óptimo.

De la concentración inicial de glucosa (16.5 g/l), la cepa ML1 no varió significativamente dicho valor en el transcurso de las mejoras, demostrando su efecto placebo para la producción. Sin embargo, la concentración de dicho monosacárido en los caldos de la cepa ACM2 fue aumentando paulatinamente, demostrando su positivo efecto, con una regresión (R^2) de 0.98 (Gráfico 5.2). Todo lo contrario ocurrió con almidón, invirtiéndose los efectos, ya predichos por la técnica de Plackett y Burman. Coincidiendo igualmente y en todos los demás casos con lo esperado, la levadura (R^2 de 0.98 y 0.73 en ML1 y ACM2 respectivamente. Gráfica 5.4) y la peptona (R^2 0.46 y 0.61. Gráfica 5.6) mostraron una tendencia a incrementar su concentración, mientras que el extracto de malta no varió (de 5.5 g/l de partida, evolucionó a 5.4 y 5.6 g/l para ML1 y ACM2 respectivamente. Tabla 5.13). El mayor efecto de inhibición sobre la actividad antitumoral detectada, se dio con HK_2PO_4 en ML1, donde se obtuvo el mejor ajuste a una curva logarítmica con asíntota negativa ($R^2 = 0.996$. Gráfica 5.7). La tendencia a la baja de la concentración de CaCO_3 quedó patente en la Gráfica 5.8.

Para la comprobación de la mejora, se fermentaron comparativamente con los medios deducidos de los promedios iniciales de cada nutriente (Media-1 de Tablas 5.11 y 5.12) y con las concentraciones optimizadas (Tabla 5.13) para cada una de las cepas. En los gráficos 6.1 y 6.2 se observan la optimización producida.



Gráficos 6.1 y 6.2.- Curvas de producción en ML1 y ACM2 antes y después de la optimización

Aunque las potencias de actividad antitumoral mejoraron a 144 h, que fue el punto de muestreo en la optimización realizada, las evoluciones de las curvas de producción de actividad fueron claramente diferentes. La cepa ML1 no sólo mejoró a los 6 días de cultivo, sino que mantuvo en niveles altos las potencias de actividad antitumoral (PAT) durante más tiempo, cosa que no ocurrió con ACM2. Las causas de las diferencias en la caída de la producción pueden ser debidas al agotamiento de los niveles de almidón en el medio, y a que las cantidades de fuentes proteicas eran muy similares entre los dos microorganismos,

sin descartar posibles efectos inhibitorios de la regulación de la biosíntesis causados por niveles altos fosfatos (*DeWitt et al.*, 1989).

Para conocer las interrelaciones entre nutrientes se realizó un estudio de correlación múltiple mediante un diseño central compuesto de Box-Wilson, también llamado Box-Behnker (*Greasham e Inamine*, 1986). Para facilitar los cálculos, se eligen cinco concentraciones diferentes de cada variable con efecto sobre la producción y estas concentraciones se codifican como se muestra en las Tablas 5.15 y 5.20. Con este método, se pretendió predecir cómo van a variar las producciones dentro de los rangos de concentraciones estudiadas, así como estudiar las relaciones entre una, dos o tres variables independientes.

Para medir la variabilidad propia del método se realizaron siete réplicas del punto central (Tabla 5.16 y 5.21, medios 26 a 31). Una vez obtenidos los resultados, éstos se ajustaron a diferentes funciones como se especifica en resultados. En las dos cepas, se obtuvieron los mejores parámetros de ajuste (mejores coeficientes de Fisher (regresión / desviación)) al ajustar los datos a una función del tipo "efecto lineal + binaria + ternaria + cuadrática". El índice de correlación múltiple (R) fue alto en ambos casos (0.77 para ML1 y 0.83 para ACM2).

De las tablas 5.18 y 5.23 se dedujo la respuesta sobre producción que tenían las posibles combinaciones de nutrientes. En ML1, tal y como se discutió por la interpretación de Plackett y Burman, el almidón (3.61×10^{-2}) y la levadura (7.36×10^{-2}) mostraron efectos positivos en sus coeficientes lineales, siendo negativos para peptona (-6.86×10^{-2}) y fosfatos (-4.82×10^{-2}). Las relaciones binarias entre almidón + levadura (9.29×10^{-2}) y almidón + peptona (10.34×10^{-2}) fueron positivas, siendo negativas (-5.40×10^{-2}) en peptona + fosfatos. Cuando se analizan tres variables, mostraron efectos negativos todas las que contengan fosfatos y sólo fue positiva la interrelación entre almidón + peptona + levadura. El análisis de las relaciones cuadráticas (X^2) mostró que de manera general se produce una disminución de la producción conforme nos alejamos del punto medio de concentraciones ensayadas. A la vista de ello, cabe deducir que la selección de los valores en el punto central ha sido adecuada.

En ACM2, los coeficientes lineales fueron en general, bajos, destacando el efecto negativo del carbonato (-3.32×10^{-2}) sobre la producción. Los coeficientes binarios fueron positivos entre las interacciones glucosa + levadura (5.26×10^{-2}), peptona + levadura (6.71×10^{-2}) y glucosa + levadura (1.34×10^{-2}) y negativos en todos los que acompañen al incremento del carbonato (lo cual coincide con el valor de t de Student en Plackett y Burman). Las relaciones ternarias son ya difíciles de analizar y se incluyeron no ya para un mejor entendimiento del proceso sino para un más preciso ajuste de la curva, con lo que se mejoraría el poder predictivo de la función. No se dieron valores altos de coeficientes cuadráticos, lo que podría indicar que en este caso no habría grandes aumentos de la producción conforme nos alejamos del punto central, el cual no está cerca de los valores óptimos en el rango ensayado.

A continuación se calcularon los valores de producción predichos por la función de ajuste polinomial y se compararon con los reales obtenidos (Tabla 5.19). Para ML1 se obtuvieron unas coincidencias óptimas cuando los valores codificados de peptona son inferiores a los fijados como en el punto central (codificaciones -1 y -2), pero al formular el medio con codificación 0 ó +1 el tanto por ciento de coincidencia decae, siendo los peores valores (>100 y 80% de diferencia) cuando ésta se encuentra en +2. Todo ello era predecible al calcular como -6.86×10^{-2} el coeficiente lineal para peptona. Los fosfatos también mostraron similar acción, aunque menos acentuada. Las respuestas más bajas (menor producción) se dieron cuanto más bajos eran los valores de levadura (-2) en la muestra 21 y almidón (-2) en la muestra 17.

Los valores deducidos de la Tabla 5.24 para ACM2 no aparecen tan claros. Las diferencias entre los valores esperados y los obtenidos son mayores, así como las diferencias entre los puntos centrales. Esto indica la existencia de otros factores que influirían en la producción y que no han sido tenidos en cuenta en la función de ajuste.

A la vista de todo ello, cabe deducir que ambas cepas presentan diferentes comportamientos, siendo *Micromonospora sp.* ML1, además de mejor productora, la que más se asemeja a los parámetros estándar de regulación de la síntesis de metabolitos secundarios (DeWitt *et al.*, 1989; Calam, 1987), donde glucosa y altos niveles de fosfatos suelen ser inhibidores de producción y los almidones aportan la fuente de carbono a largo plazo. No se puede hablar en este caso de diferencias entre cepas, ya que la constitución de medios en ambas cepas fue diferente.

6.4.- EFECTO DE ADICIONES EXÓGENAS SOBRE LA POTENCIA DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN CEPAS PRODUCTORAS DE TIOCORALINAS

En la Tabla 5.26 se muestra el resultado obtenido tras la adición a una concentración de 2.5 mM, de siete ácidos quinoxalínicos y quinolín carboxílicos a las 48 h de crecimiento sobre caldos de ML1. En cuatro casos, se produjo una reducción del 70% de la potencia de actividad antitumoral referida a una muestra control (sin adición), aumentando las IC₅₀ de 2.5 µg/ml a valores entre 7.5 a 10 µg/ml.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Gauvreau y Waring en 1984, donde realizaron una adición similar con *Streptomyces echinatus*, productor de equinomicina. En este organismo se detectó una inhibición de la actividad antimicrobiana de los extractos en el 35% de los reactivos añadidos, mientras que mejoró el rendimiento en 5 de los 36 adicionados y el resto no produjo variaciones en la actividad.

Para profundizar en el estudio del efecto de la adición de grupos análogos al grupo cromóforo presente en la estructura de tiocoralina (ácido 3-hidroxi-quinolín-2-carboxílico), se seleccionaron los grupos cromóforos comerciales ANA-1 y ANA-2 (ácidos 4-hidroxi-quinolín-2-carboxílico y 3-hidroxi-2-quinolín-carboxílico), demostrando a todas las

concentraciones empleadas, un retardo en la aparición de actividad antitumoral (Gráficos 5.9 a 5.12), aunque en las muestras tomadas a 192 h, superaban en actividad al control. Este resultado podría explicar la alta tasa de inhibiciones encontradas con la experimentación anterior, generalizando que el retardo en aparición de actividad antitumoral en caldo podría ser un hecho casi general en las cepas productoras de tiocoralinas.

Aunque el objetivo perseguido fue la detección de mejoras en las valoraciones de actividad antitumoral de los extractos obtenidos, no se tuvieron indicios de biosíntesis de derivados con diferente selectividad frente a las líneas tumorales empleadas, ni se detectaron nuevos productos con absorción a 360 nm que mostraran inhibición frente a *Bacillus subtilis*. La búsqueda de derivados de tiocoralinas que asimilen los grupos cromóforos exógenos necesitaría de una metodología más precisa, acoplada a análisis por HPLC, tal y como describieron Gauvreau y Waring en 1984.

Las adiciones de aminoácidos (L-cisteína, L-glicina, L-tirosina y L-triptófano) se realizaron empleando la misma metodología que el caso anterior. Se añadieron en cantidad suficiente para alcanzar unas concentraciones finales de 0.25 mM, 2 mM y 5 mM, de cada uno, a las 48 h de crecimiento para que no interfiriesen en el normal crecimiento previo a la biosíntesis de metabolitos secundarios. El medio seleccionado fue MB para que tanto ML1 como ACM2 tuvieran semejantes potencias de actividad. Dicho medio de cultivo (ver Materiales) estuvo compuesto por glucosa como única fuente carbohidratada y con extracto de malta y levadura como fuentes proteicas, condiciones *a priori* óptimas para ACM2.

Los aminoácidos integrantes en la estructura de las tiocoralinas, glicina y cisteína, coinciden en su biosíntesis, al proceder de la ruta 3-fosfoglicerato a serina y de ésta, por incorporación de H₂S a cisteína o por pérdida del formaldehído a glicina. Al ser añadidos al medio, se presentaron diferentes respuestas (Gráficas 5.13, 5.14, 5.19 y 5.20). La aportación de 0.25 mM de glicina al medio, no afectó a la producción. Sin embargo, al añadir glicina 2 mM, la actividad antitumoral aumentó considerablemente frente a P388, mejorando la IC₅₀ en más de tres veces en cada una de las cepas (Anexo 3).

Se apreciaron diferencias significativas entre las cepas bacterianas con el aporte de cisteína exógena, inhibiendo fuertemente la producción a 72 h, diferencias que fueron incrementándose posteriormente, siendo éste hecho más destacado en ACM2, donde todas las concentraciones empleadas fueron estimulantes de la actividad en los posteriores muestreos (a 144 h y a 192 h).

Este hecho diferencial refuerza la teoría de la diferente regulación de la biosíntesis de un mismo antibiótico en dos microorganismos próximos taxonómicamente (Anexo 1).

Sin embargo, los dos microorganismos mostraron similar comportamiento al añadir al medio tirosina y triptófano. En este caso se produjo una clara disminución en las actividades registradas en cualquiera de las concentraciones empleadas y aunque a 96 h, la cepa ML1 no acentuó esta inhibición en la producción, la falta de actividad fue casi absoluta posteriormente (Gráficas 5.15 y 5.16). Los resultados obtenidos al adicionar triptófano fueron opuestos, aunque corresponderían a un aumento de masa con una

consiguiente disminución en la actividad específica del extracto sin que por otra parte haya una disminución sensible en la actividad total del caldo de fermentación (Anexo 3).

En el trabajo realizado por Arai y colaboradores (1980) se dieron las mismas circunstancias, donde la tirosina inhibió la biosíntesis de saframisin y se estimuló con la adición de triptófano. Por estudios realizados con aminoácidos marcados radioactivamente, estos autores determinaron que la tirosina se incorporaba directamente a la estructura del compuesto y que dicha regulación se debía a procesos de retroalimentación; es decir, a la inhibición de la biosíntesis al detectar una acumulación de sustratos. Aunque las saframisin y tiocoralinas sólo presentan en común el ser antibióticos producidos por actinomicetos como metabolitos secundarios, sin ningún tipo de relación estructural, los datos obtenidos sugieren que podría estar ocurriendo algún tipo de regulación de la biosíntesis parecido. Futuros estudios de incorporación de aminoácidos radioactivos a la molécula podrían aclarar dicho punto. La biosíntesis de los grupos cromóforos podría estar regulada por alguno de estos dos aminoácidos, que comparten la ruta del ácido shikímico, aunque luego divergen en tirosina y fenilalanina por un lado y tirosina por otro (*Stainer et al.*, 1981).

6.5.- NUEVAS TIOCORALINAS: RELACIÓN ESTRUCTURA – ACTIVIDAD

Fruto de este trabajo ha sido el obtener, además de la tiocoralina A (TA), ya descrita previamente, otros compuestos muy relacionados. Su aislamiento se debió a la comprobación de la existencia de otros compuestos, más polares, con fuerte absorción a 360 nm y que producían efectos antimicrobianos y antitumorales.

La dificultad general en la purificación de las tiocoralinas estriba en la baja solubilidad mostrada, la fuerte retención en placas de silicagel que presentan al interaccionar con la sílice y la gran semejanza estructural que complica cualquier técnica de separación.

La estructura de la tiocoralina B (TB) fue elucidada a partir de los datos obtenidos por RMN y masas, comparándolos con las asignaciones conocidas de la TA. Se trata de una estructura idéntica salvo que no presenta puente disulfuro, sino formación de -SH HS-.

La elucidación estructural completa de la tiocoralina C se tuvo que realizar por la acetilación del compuesto, purificándose el derivado TCa, ya que facilitó el análisis de las señales de resonancia (espectros de ^1H y ^{13}C RMN en Anexos 4.2 y 5.2). Se confirmó que realmente correspondía a la estructura del BE-22179 (*Okada et al.*, 1994).

La tiocoralina E (TE), con peso molecular de 1.062 se trata de una tiocoralina cuyas características estructurales difieren de todas las anteriores. La elucidación de su estructura podría suponer el descubrimiento de un nuevo compuesto antitumoral.

Los resultados obtenidos en el comportamiento antimicrobiano fueron, en general muy inferiores al encontrado con la equinomicina, excepto la gran actividad de TC frente a *Staphylococcus aureus*. La difusión sobre agar de las tiocoralinas fue muy pobre, de hecho sólo se han registrado 6 mm de diferencia entre los halos medidos entre concentraciones de

20 µg/disco a 0.005 µg/disco. La TC presenta, en las condiciones experimentales realizadas, mejor actividad que TA, siendo todas las tiocoralinas inactivas frente a Gram negativos.

De la Tabla 1.2 de la Introducción, se deduce que influyen más en la acción antimicrobiana el esqueleto polipeptídico que el tipo de grupo cromóforo en este tipo de compuestos. Entre la equinomicina y la triostina A, cuya única diferencia estriba en el poseer el puente disulfuro (triostin A), existe diferente actividad antimicrobiana. La sustitución de los grupos quinoxalínicos por quinolínicos en la triostina A, también alteró la MIC frente a Gram positivos, pero no ocurrió lo mismo con *E.coli*, tal vez debido a diferencias de permeabilidad de la membrana externa (Cornish *et al.*, 1983).

Por otro lado, la pérdida de grupos S-metilos y del enlace disulfuro afectan significativamente a la actividad antimicrobiana, posiblemente por diferente permeabilidad en membrana, o por diferente conformación en medio acuoso (Alfredson *et al.*, 1981).

El perfil de actividades antitumorales *in vitro*, reflejado en la tabla 5.31 de Resultados, muestra la gran diferencia existente entre la equinomicina y las tiocoralinas. La primera, muy activa frente a la línea de melanoma humano (MEL28), con IC₅₀ de 0.18 nM, presenta una clara selectividad, ya que las actividades encontradas en líneas de adenocarcinomas de pulmón y colon son 2,5 veces inferiores (0.45 nM), y del orden de 10 veces menos activa frente a leucemia de ratón y línea inmortalizada de células no tumorales empleada como control de toxicidad. Las tiocoralinas A y C presentan básicamente el mismo perfil, donde no hay diferencias significativas de actividad antitumoral entre las líneas tumorales empleadas (IC₅₀ 1.7 a 1.9 nM). Sin embargo, se pueden considerar cinco veces menos tóxicas (IC₅₀ 9 nM).

Las características reales de selectividad deben ser consideradas por las relaciones existentes entre las actividades en cada línea celular tumoral y con la línea no tumoral. En la Tabla 6.1 se muestran los índices calculados en cada caso.

Tabla 6.1.- Relación entre actividades tumorales y toxicidad "in vitro"

	P388/toxicidad	A549/toxicidad	HT29/toxicidad	MEL28/toxicidad
equinomicina	1	0.25	0.25	0.1
TA	0.2	0.2	0.2	0.2
TB	0.5	0.25	0.25	0.25
TC	0.2	0.2	0.2	0.2
TE	0.2	0.25	0.25	0.25

6.6.- ESTUDIOS DE UNIÓN DE TIOCORALINAS AL PLÁSMIDO pBR322

Uno de los efectos detectados por la bis-intercalación de los compuestos quinoxalínicos y quinolínicos es la alteración de la movilidad electroforética del complejo DNA – compuesto. Esta alteración ha sido descrita para la sandramicina (Boger *et al.*, 1996),

luzopeptinas (*Fox et al.*, 1988) y el compuesto UK-63052 (*Fox*, 1990). Sin embargo, no estaba tan claro en el caso de la equinomicina, donde se disociaba del plásmido en el transcurso de la electroforesis (*Fox*, 1990).

Al cumplir las tiocoralinas todas las características propias de esa familia de compuestos (ver 1.3 en Introducción), cabría esperar que ocurriera dicha diferencia de movilidad

En la Figura 5.2 se puede ver esta alteración, observándose retardos de movilidad electroforética del plásmido en contacto con tiocoralina A y equinomicina a partir de 0.9 μ M. Lo mismo puede aplicarse a TB (Fig. 5.5, calles 13 y 14) y en los casos de TC y TB, aunque los casos pertenecientes a éstas últimas no se muestran en este trabajo.

Para conocer si existió una ruptura del DNA, si el efecto de unión se debió a enlaces covalentes y conocer la fuerza de unión, se diseñaron los siguientes experimentos:

- Después de dejar incubar el plásmido pBR322 (0.15 μ g) con diferentes concentraciones de TA y equinomicina a 37°C durante 30 min., se realizó la electroforesis, en presencia de bromuro de etidio (BrEt), agente fuertemente intercalante del DNA. Los resultados demostraron que el plásmido recuperó totalmente la movilidad, por lo que se descartaron posibles rupturas del plásmido y el BrEt podría haber desplazado los compuestos bis-intercalados, de lo que podría deducirse que el mecanismo de unión de estos compuestos era no covalente y la constante de unión al ADN menor que la del bromuro de etidio.
- Para confirmar dicha hipótesis, se realizó la incubación de nuevo, en las mismas condiciones, pero después de dicha incubación, se realizó la extracción del plásmido con fenol-cloroformo (tal y como se detalla en Métodos). En caso de una unión no covalente de la tiocoralina al DNA, dicho compuesto se disolvería en la fase orgánica dejando libre el plásmido. Al visualizar el plásmido tras la electroforesis, realizada sin BrEt, bajo luz UV de 254 nm (Fig. 5.4) se comprobó que el plásmido había recuperado la movilidad exactamente igual que el control (plásmido sin preincubar con tiocoralina).

6.7.- EFECTO DE BIS-INTERCALACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE TOPOISOMERASA II

Okada describió en 1994 al compuesto BE-22179 como inhibidor de la topoisomerasa II, hecho que demostró Yoshinari en el mismo año. Pero las dos publicaciones dejaron claro que su compuesto (idéntico a TC por ^1H RMN y descripción cromatográfica) no era inhibidor de la topoisomerasa I ni la topoisomerasa II.

La actividad enzimática de la topoisomerasa II se basa en la ruptura las dos cadenas de DNA allí donde se produce tensión por superenrollamiento, uniéndolas posteriormente, después de actuación de girasas, provocando la relajación (*Lock y Ross*, 1987). El NCI define a los compuestos cuyo mecanismo de acción se basa en el impedimiento de unión de las dos cadenas una vez que han sido cortadas (*Foye*, 1995) como inhibidores de topoisomerasa II DNA-*cleavage*. Subdividiéndolos a su vez en intercalantes, como la

actinomicina D, la doxorubicina y la daunorubicina y no intercalantes como el etopósido VP-16.

La reacción de relajación llevada a cabo por la topoisomerasa II, se traduce en la aparición de bandas de relajación del plásmido pBR322 superenrollado, con desaparición de la banda original y aparición de otras bandas de menor movilidad. En el caso de las tiocoralinas y la equinomicina, no se pudo comprobar la aparición de bandas de relajación al incubar la topoisomerasa II conjuntamente con el plásmido y los citados compuestos, ya que la movilidad electroforética del complejo es distinta tanto al del plásmido superenrollado como a la del plásmido relajado (Figura 5.5). Por lo tanto, el ensayo de actividad inhibidora de la topoisomerasa II mediante alteraciones de movilidad electroforética no es adecuado en el caso de ensayar compuestos que *per se* alteren la movilidad electroforética del plásmido superenrollado. Como control, se usó la aplidina, compuesto que no altera la movilidad electroforética del plásmido superenrollado en el que sí se apreció la aparición de las bandas de relajación producidas por la topoisomerasa II.

Para comprobar si la bis-intercalación de equinomicina y tiocoralina A bloqueaba la actividad catalítica de la enzima, se llevó a cabo la extracción del plásmido después de haber sido incubado en presencia de los compuestos y de la enzima, realizándose la electroforesis en ausencia de BrEt. El resultado de dicho ensayo queda patente en Figura 5.6 en la que se puede apreciar la inhibición de la acción de la enzima con la equinomicina y la tiocoralina A. Ambos antibióticos no alteraron la actividad enzimática a concentraciones iguales o inferiores a 0.09 μM (calles 5 y 8). Se repitió la misma experimentación con topoisomerasa II humana, obteniéndose exactamente los mismos resultados.

6.9.- COMPARACIONES GENERALES ENTRE TIOCORALINA A Y EQUINOMICINA

Como resumen, ambos compuestos presentaron una serie de características comunes:

- Están producidos por actinomicetos.
- Su estructura se compone de un ciclo de ocho aminoácidos, con dos grupos cromóforos en los extremos.
- Presentan efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas.
- Son agentes antitumorales, destacando sus efectos *in vivo* frente a líneas celulares de leucemia de ratón P388 y melanoma B16.
- Provocan por igual retardo en la migración electroforética del plásmido pBR322.
- Inhiben la acción catalítica de la topoisomerasa II en concentraciones cercanas a 1 μM .

Las diferencias encontradas pueden ser resumidas en los siguientes puntos:

- Presentan diferentes secuencias peptídicas. La tiocoralina A presenta un puente disulfuro intercatenario, mientras que la equinomicina presenta un puente tioacetal.

- Los grupos cromóforos de la equinomicina son ácidos quinoxalínicos, mientras que en tiocoralinas son derivados del ácido quinolínico, con un grupo hidroxilo en posición 3 (ácido quináldico).
- La equinomicina es mejor agente antimicrobiano que la tiocoralina A.
- La selectividad de acción antitumoral *in vitro* es muy diferente. Mientras que TA presentó las mismas IC_{50} en todas las líneas, la equinomicina mostró preferencias sobre MEL28, siendo menos activa frente a células P388.
- La equinomicina es cinco veces más tóxica *in vitro* (IC_{50} 1.82 nM frente a 8.65 nM en TA).
- Afectan de manera diferente a la síntesis del DNA y del RNA. La equinomicina inhibe doscientas veces más la síntesis de RNA que la del DNA, la TA inhibe cincuenta veces más la síntesis de RNA que la del DNA, mientras que la TC sólo inhibe cinco veces más la síntesis del RNA que la del DNA.

De estos datos se desprende que la secuencia de los aminoácidos (Lee y Waring, 1978), junto con la longitud del compuesto (10.2 Å en equinomicina, desconocido en TA) y las sustituciones de los grupos cromóforos (Fox, 1990) (hidroxilo en posición 3 del ácido quinolínico en TA y ninguna en el ácido quinoxalínico de la equinomicina) determinarían las secuencias nucleotídicas de reconocimiento.

7.- CONCLUSIONES

Las conclusiones que se derivan de esta tesis se resumen en los siguientes puntos:

1. Las tiocoralinas deben ser incluidas dentro del grupo de antibióticos quinoxalínicos y quinolínicos por sus características comunes.
2. La ruta biosintética para la producción de la tiocoralina y de antibióticos quinoxalínicos se encuentra presente en microorganismos pertenecientes a diferentes especies y familias dentro de la familia Actinomycetaceae, no encontrándose por tanto restringidos a una misma especie bacteriana.
3. La regulación de la producción por fermentación de las tiocoralinas es distinta dependiendo del organismo productor. Diferencias fundamentales estriban en el efecto del fosfato y de la glucosa, conocidos reguladores de la producción de metabolitos secundarios sobre cada una de las dos especies productoras de tiocoralinas.
4. Se han aislado compuestos muy similares a la tiocoralina A aunque muy minoritarios. La tiocoralina B presenta una ruptura del puente disulfuro que le confiere menor actividad antimicrobiana y antitumoral. La tiocoralina C, con posible pérdida de los grupos S-metilos, fue mejor agente antimicrobiano frente a Gram positivos aunque mostró el mismo perfil antitumoral *in vitro* que la tiocoralina A.
5. La unión de tiocoralina A y equinomicina al plásmido pBR322, parece realizarse por procesos de bis-intercalación. Esta unión es no covalente y no produce rupturas en el plásmido.
6. En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, tanto la tiocoralina A como la equinomicina impidieron la actividad catalítica de la topoisomerasa II a concentraciones superiores a 0.9 μM .
7. Existen claras diferencias entre equinomicina y tiocoralina A. Aunque la tiocoralina A presenta una menor selectividad *in vitro* frente a diferentes líneas celulares tumorales, su menor toxicidad nos hace considerarle un buen candidato para futuros ensayos clínicos.

8.- BIBLIOGRAFÍA

1. Alfredson, T.V.; Maki, A.H.; Adaskaveg, M.E.; Excoffier, J.L.; Waring, M.J. (1990) Liquid chromatographic investigation of quinoxaline antibiotics and their analogues by means of ultraviolet diode-array detection. *J. Chromatography*, 507: 277-292
2. Alfredson, T.V.; Maki, A.H.; Waring, M.J. (1991) Conformational heterogeneity of quinoxaline peptides in solution. *Biopolymers*, 31: 1689-1708
3. Arai, T.; Takahashi, K.; Ishiguro, K.; Yazawa, K. (1980) Increased production of saframycin A and isolation of saframycin S. *J. Antibiotics*, 33: 951-960
4. Arcamone, F.; Bizioli, F.; Canevazzi, G.; Grein, A. Patente alemana: 1,027,667. *Chem. Abstracts*, 55: 2012
5. Arnold, E.; Clardy, J. (1981) Crystal and molecular structure of BBM-928 A, a novel antitumor antibiotic from *Actinomadura luzonensis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 103: 1243-1244
6. Barlitz, D. M.; O'Herron, F.A.; Bush, J.; Vyas, D.M.; Nettleton, D.E.; Grulich, R.E.; Bradner, W.T.; Doyle, T.W.; Arnold, E.; Clardy, J. (1981) *J. Antibiotics*, 34: 1544
7. Bergamaschi, D.; Faretta, M.; Ronzoni, S.; Taverna, S.; De Feudis, P.; Bonfanti, M.; Guidi, G.; Faircloth, G.; Jimeno, J.; D'Incalci, M.; Erba, E. (1996) Flow cytometric analysis of cell cycle phase perturbations induced by Thiocoraline, a new marine-derived anticancer compound. Pendiente de publicación
8. Bergeron, R.J.; Cavanaugh, P.F. Jr.; Kline, S.J.; Hughes, G. Jr.; Elliot, G.T.; Porter, C.W. (1984) Antineoplastic and antiherpetic activity of spermidine catecholamine iron chelators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121: 848-854
9. Bernan, V.S.; Greenstein, M.; Maiese, W.M. (1997) Marine microorganisms as a source of new natural products. *Adv. Appl. Microbiol.*, 43: 57-90
10. Boeck, L.D.; Favret, M.E.; Wetzel, R.W. (1992) Biosynthesis of thiopeptide antibiotic A10255 in stirred reactors using a chemically defined medium supplemented with continuous nutrient feeds. *J. Antibiotics*, 45 (8): 1278-1285
11. Boger, D.L.; Chen, J-H. (1993) (-) Sandramycin: total synthesis and preliminary DNA binding properties. *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 11624-11625
12. Boger, D.L.; Chen, J-H.; Saionz, K.W. (1996) (-) Sandramycin: total synthesis and characterization of DNA binding properties. *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 1629-1644
13. Busquet, A.P. (1980) Mecanismo de acción de los antibióticos. En: Drobnic, L; Salvá, J.A. (ed.) Curso de antibioticoterapia. Hospital General "Ntra. Sra. del Mar". Barcelona.
14. Calam, T.C. (1987) Subsidiary factors important in production fermentations, pp 57-65. En: J. Baddiley; N.H. Carey; J.F. Davidson; I.J. Higgins; W.G. Potter

- (eds.) Process development in antibiotic fermentations. Cambridge University Press. Cambridge.
15. Cellai, L.; Di Filippo, P.; Iannelli, M.A.; Antonio, I.; Martelli, S.; Benedetto, A.; Di Caro, A.; Cholody, W.M. (1994) Acridine-like compounds inhibit HIV-1 reverse transcriptase by intercalating the template-primer hybrid. *Pharm. Pharmacol. Letters*, 3: 198-201
 16. Chen, H & Patel, D.J. (1995) Solution structure of a quinomycin bisintercalator-DNA complex. *J. Mol. Biol.*, 246 (1): 64-79
 17. Constantino, P.; De Santis, P.; Ughetto, G. (1978) Circular dichroism studies on the echinomycin-DNA complex. *FEBS Letters*, 88: 349-352
 18. Corbaz, R.; Ettlinger, L.; Gäumann, E.; Keller-Schierlein, W.; Kradolfer, F.; Neipp, L.; Prelog, V.; Rcusser, P.; Zähler, H. (1957) Metabolic products of actinomycetes. *Helv. Chim. Acta*, 40: 199-204
 19. Cornish, A.; Fox, K.R.; Waring, J. (1983) Preparation and DNA-binding properties of substituted Triostin antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23 (2): 221-231
 20. Dell, A.; Williams, D.H.; Morris, H.R.; Smith, G.A.; Feeney, J.; Roberts, G.C. (1975) Structure revision of the antibiotic Echinomycin. *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (9): 2497-2562
 21. DeWitt, J.P.; Jackson, J.V.; Paulus, T.J. (1989) Actinomycetes. En: J.O. Neway (ed.), Fermentation process development of industrial organisms. Marcel Dekker, INC. New York, Basel.
 22. Di Marco, A.; Gaetani, M.; Oreazzi, P.; Scarpinato, B.M.; Silvestrini, R.; Soldati, M.; Dasdia, T.; Valentini, L. (1964) *Nature*, 201 (4920): 706-707
 23. Di Marco, A.; Arcamone, F.; Zunino, F. (1975) Daunomycin (daunorubicin) and Adriamycin and structural analogues: Biological activity and mechanism of action. En: J.W. Corcoran and F.E. Hahn (eds.), Antibiotics III: Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, N.York.
 24. Espliego, F. (1996) Actinomicetos marinos: aislamiento, taxonomía y producción de metabolitos con actividad antitumoral. *Tesis doctoral*. Facultad de Biología, Universidad de León.
 25. Fernández Chimeno, R.I. (1997) Micromonosporáceas marinas: Aislamiento, taxonomía y producción de metabolitos con actividad antitumoral. *Tesis doctoral*. Facultad de Biología, Universidad de León.
 26. Fenical, W. (1993) *Chem. Rev.*, 93: 1673
 27. Finlay, A.C.; Hochstein, F.A.; Sobin, B.A.; Murphy, F.X. (1951) *J. Am. Soc.*, 73: 341

28. Foster, B.J.; Clagett-Carr, K.; Shoemaker, D.D.; Suffness, M.; Plowman, J.; Trissel, L.A.; Grieshaber, C.K. (1986) Echinomycin: The first bifunctional intercalating agent in clinical trials. *Invest. New Drugs*, 3: 403-410
29. Fox, K.R.; Davies, H.; Adams, G.R.; Portugal, J.; Waring, M.J. (1988) Sequence-specific binding of luzopeptins to DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 16: 2489-2507
30. Fox, K.R.; (1990) Footprinting studies of the interaction of Quinomycin antibiotic UK63052 with DNA: Comparison with Echinomycin. *J. Antibiotics*, 43 (10): 1307-1315
31. Gauvreau, D.; Waring, M.J. (1984) Directed biosynthesis of novel derivatives of echinomycin by *Streptomyces echinatus*. I. Effect of exogenous analogues of quinoxaline-2-carboxylic acid on the fermentation. *Can. J. Microbiol.*, 30: 439-450
32. Gauvreau, D.; Waring, M.J. (1984) Directed biosynthesis of novel derivatives of echinomycin by *Streptomyces echinatus*. II. Purification and structure elucidation. *Can. J. Microbiol.*, 30: 730-738
33. Goldman, M.E.; Nunberg, J.H.; O'Brien, J.A.; Quintero, J.C.; Schleif, W.A.; Freud, K.F.; Gaul, S.L. (1991) Pyridinone derivatives: specific human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors with antiviral activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6863-6867
34. Goldman, M.E.; Salituro, G.S.; Bowen, J.A.; Williamson, J.M.; Zink, D.L.; Schleif, W.A.; Emini, E.A. (1990) Inhibition of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase activity by rubromycins: Competitive interaction at the template-primer site. *Mol. Pharmacol.*, 38: 20-25
35. Goodisman, J. & Dabrowiak, J.C. (1985) Theoretical analysis of the footprinting experiment. *J. Biomolec. Struct. Dynam.*, 2: 967-979
36. Goodisman, J. & Dabrowiak, J.C. (1991) Quantitative aspects of DNAase I footprinting. En: L.H. Hurley (ed.), *Advances in DNA Sequence Specific Agents*. American Chemical Society, Washington D.C.
37. Greasmaham, R. & Inamine, E. (1986) Nutritional improvement of processes. En: A.L. Demain & N.A. Solomon (eds.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, chapter 4, pp. 41-48
38. Grein, A.; Spalla, C.; Di Marco, A.; Canevazzi, G. (1963) Descrizione e classificazione di un actinomicete, *Streptomyces peuceticus* sp. Nova, produttore di una sostanza ad attività antitumorale: la daunomicina. *Giorn. Microbiol.*, 11: 109-118
39. Grundy, W.E.; Goldstein, A.W.; Rieker, C.J.; Hanes, M.E.; Warren, H.B. Jr.; Sylvester, J.C. (1953) *Antibiot. Chemother.*, 3: 1215
40. Guerrant, G.O.; Moss, C.W. (1984) Determination of monosaccharides as aldonitrile o-methyloxime, alditol and cyclitol acetate derivatives by gas chromatography. *Anal. Chem.*, 56: 633-638

41. En: *E.F. Hale; E. Candlife; P.E. Reynolds; M.H. Richmond; Waring, M.J.* (eds.), (1972) *The molecular basis of Antibiotic Action*. Wiley Publishing Company, London, pp. 173-277
42. *Hanka, L.J.; Dietz, A.; Gerpheide, A.; Kuentzel, S.L.; Martin, D.G.* (1978) *J. Antibiotics*, 31: 1211
43. *Hasegawa, T.; Takizawa, M.; Tanida, S.* (1983) A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29: 319-322
44. *Hata, T.; Sano, Y.; Sugawara, R.; Matsumae, A.; Kanamavi, K.; Shima, T.; Hoshi, T.* (1956) *J. Antibiotics*, 9-A: 141
45. *Hendrix, C.* (1980) Through the response surface with test tube and pipe wrench. *Chemtech.*, August, 488-497
46. *Hill, G.C.; Remers, W.A.* (1991) *J. Med. Chem.*, 34: 1990
47. *Hsiang, Y-H.; Hertzberg, R.; Hecht, S.; Liu, L.F.* (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 260: 14873-14878
48. *Huang, C.H.; Mirabelli, C.K.; Mong, S.; Crooke, S.T.* (1983) Intermolecular cross-linking of DNA through bifunctional intercalation of an antitumor antibiotic, luzopeptin A (BBM-928A). *Cancer Res.*, 43: 2718-27224
49. *Hunt, G.R. & Stieber, R.W.* (1986) Inoculum development. En: *A.L. Demain & N.A. Solomon* (eds.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, chapter 3, pp. 32-40
50. *Ikeda, Y.; Idemoto, H.; Hirayama, F.; Yamamoto, K.; Iwao, K.; Asao, T.; Munakata, T.* (1983) Safracins, new antitumor antibiotics. I. Producing organism, fermentation and isolation. *J. Antibiotics*, 3-A: 1279-1283
51. *Ikeda, Y.; Matsuki, H.; Ogawa, T.; Munakata, T.* (1983) Safracins, new antitumor antibiotics. II. Physicochemical properties and chemical structures. *J. Antibiotics* 36-B: 1284-1289
52. *Inouye, Y.; Take, Y.; Nakamura, S.* (1987) Screening for inhibitors of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and effect on the replication of AIDS-virus. *J. Antibiotics*, 40: 100-104
53. *Ishiguro, K.; Takahashi, K.; Yazawa, K.; Sakiyama, S.; Arai, T.* (1981) Binding of Saframycin A, a heterocyclic quinone anti-tumor antibiotic to DNA as revealed by the use of the antibiotic labeled with [¹⁴C] Tyrosine or [¹⁴C] Cyanide. *J. Biol. Chem.*, 256: 2162-2167
54. *Jiménez, A.* (1990) Genética molecular de la síntesis de antibióticos en Actinomycetes. En: *J. Casadesús & F. Ruiz-Berraquero* (eds.), *Manuales Universitarios. Microbiología*, pp. 215-220

55. Faulkner, D.J. (1993) Marine natural products. *Nat. Prod. Reports*, 9: 497-539
56. Kishi, K.; Yazawa, K.; Takahashi, K.; Mikami, Y.; Arai, T. (1984) Structure-activity relationships of saframycins. *J. Antibiotics*, 37: 847-852
57. Konishi, M.; Ohkuma, H.; Sakai, F.; Tsuno, T.; Koshiyama, H.; Naito, T.; Kawaguchi, H. (1981) BBM-928, a new antitumor antibiotic complex. III. Structure determination of BBM-928 A, B and C. *J. Antibiotics*, 34 (2): 148-159
58. Konishi, M.; Ohkuma, H.; Sakai, F.; Tsuno, T.; Koshiyama, H.; Naito, T.; Kawaguchi, H. (1981) Structures of BBM-928 A, B and C. Novel antitumor antibiotics from *Actinomadura luzonensis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 103: 1241-1243
59. Kowal, C.D.; Diven, W.F.; Kozikowski, A.B. (1983) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 24: 249 (abstract 983)
60. Lam, K.S.; Gustavson, D.R.; Hesler, G.A.; Dabrah, T.T.; Matson, J.A.; Berry, R.L.; Ros, W.C.; Forenza, S. (1995) Korkormicins, novel depsipeptide antitumor antibiotics from *Micromonospora* sp. C39500: Fermentation, precursor directed biosynthesis and biological activities. *J. Industrial Microbiol.*, 15: 60-65
61. Lechevalier, M.P.; Lechevalier, H.A. (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic *Actinomycetes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20: 435-443
62. Lechevalier, H.A.; Lechevalier, M.P. (1986) *Actinomycete* genera "in search of a family". En: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows & H.G. Schlegel (eds.), *The Prokaryotes*. II. chapter 159, Springer-Verlag, New York.
63. Lee, J.S. & Waring, M.J. (1978) Interaction between synthetics analogues of quinoxaline antibiotics and nucleic acids. Changes in the mechanism and specificity related to structural alterations. *Biochem. J.*, 173: 129-144
64. Lehninger, A.L. (1981) Capítulo 4 los aminoácidos, sillares de las proteínas. En: *Bioquímica*. segunda edición. Omega. Barcelona, 73-95
65. Leroy, J.L.; Gao, X.; Misra, V.; Guéron, M.; Patel, D.J. (1992) Proton exchange in DNA-luzopeptin and DNA-echinomycin bisintercalation complexes. Rates and processes of base-pair opening. *Biochemistry*, 31: 1407-1415
66. Li, M.; Whitmore, W.; Golbey, R.; Grabstald, H. (1960) Effects of combined drug therapy on metastatic cancer of the testis. *J. Am. Med. Assoc.*, 174: 1291-1299
67. Lingham, R.B.; Hsu, A.H.; O'Brien, J.A.; Martin, I.; Diez, M.T.; Hirsch, C.F. (1996) Quinoxapeptins: Novel chromodepsipeptide inhibitors of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase. I. The producing organism and biological activity. *J. Antibiotics*, 49 (3): 253-259
68. Liu, L.F. (1989) DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.*, 58: 351-375

69. Lock, R.B. & Ross, W.E. (1987) DNA topoisomerases in cancer therapy. *Anti-Cancer Drug Design*, 2: 151-164
70. Lown, J.W.; Joshua, A.V.; Lee, J.S. (1982) Molecular mechanisms of binding and single-strand scission of deoxyribonucleic acid by the antitumor antibiotics Saframycins A and C. *Biochemistry*, 21: 419-428
71. Martin, D.G.; Mizzsak, S.A.; Biles, C.; Stewart, J.C.; Baczynskyj, L.; Meulman, P.A. (1975) Structure of quinomycin antibiotics. *J. Antibiotics*, 28: 332-336
72. Matson, J.A.; Bush, J.A. (1989) Sandramycin, a novel antitumor antibiotic produced by a *Nocardioides* sp. Production, isolation, characterization and biological properties. *J. Antibiotics*, 42 (12): 1763-1767
73. Matson, J.A.; Rose, W.C.; Bush, J.A.; Myllymaki, R.; Bradner, W.T.; Doyle, T.W. (1989) Antitumor activity of chrysomycins M and V. *J. Antibiotics*, 42: 1446-1448
74. Matson, J.A.; Colson, K.L.; Belofsky, G.N.; Bleiberg, B.B. (1993) Sandramycin, a novel antitumor antibiotic produced by a *Nocardioides* sp. II. Structure determination. *J. Antibiotics*, 46 (1): 162-166
75. Mendel, D.; Dervan, P.B. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 910
76. Mensa, J.; Gatell, J.M.; Corachán, M.; Escofet, M.C.; Martínez, J.A.; Zamora, L. (1992) Guía de terapéutica microbiana, 2ª ed.. Guía antimicrobiana, Ediciones Científicas y Técnicas, S.A.
77. Meyers, E.; Cooper, R.; Trejo, W.H.; Georgopapadakou, N.; Sykes, R.B. (1983) EM5519, a new broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Antibiotics*, 36: 190-193
78. Monaghan, R.L.; Koupal, L.R. (1989) Use of the Plackett & Burman technique in a discovery program for new natural products. En: A.L. Demain, G.A. Somkuti, J.C. Hunter-Cevera & H.W. Rossmore (eds.), *Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture*, chapter 2, pp. 25-32
79. Moore, R.E. (1996) Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review. *J. Industrial Microbiol.*, 16: 134-143
80. Ohba, K.; Watabe, H.; Sasaki, T.; Takeuchi, Y.; Kodama, Y.; Nakazawa, T.; Yamamoto, H.; Shomura, T.; Sezaki, M.; Kondo, S. (1988) *J. Antibiotics*, 41: 1915-1919
81. Ohkuma, H.; Sakai, F.; Nishiyama, Y.; Ohbayashi, M.; Imanishi, H.; Konishi, M. (1980) BBM-928, a new antitumor antibiotic complex. I. Production, isolation, characterization and antitumor activity. *J. Antibiotics*, 33 (10): 1087-1097
82. Okada, H.; Suzuki, H.; Yoshinari, T.; Arakawa, H.; Okura, A.; Suda, H. (1994) A new topoisomerase II inhibitor, BE-22179, produced by a *Streptomyces*. I. Producing strain, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiotics*, 47 (2): 129-135

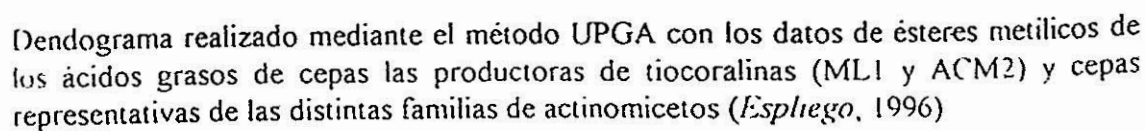
83. Oogose, K.; Hafuri, Y.; Takemori, E.; Nakata, E.; Inouye, Y.; Nakamura, S. (1987) Mechanism of inhibition of reverse transcriptase by quinone antibiotics. *J. Antibiotics*, 40 (12): 1778-1781
84. Otsuka, H.; Shoji, J. (1965) The structure of Triostin C. *Tetrahedron*, 21: 2931-2938
85. Otsuka, H.; Shoji, J. (1966) Isolation and structural study on minor components of quinoxaline antibiotics. *J. Antibiotics*, 19-A (3): 128-131
86. Otsuka, H.; Shoji, J. (1967) Structural studies on the minor components of quinoxaline antibiotics. *Tetrahedron*, 23: 1525-1542
87. Otsuka, H.; Shoji, J. Kawano, K.; Kyogoku, Y. (1976) Structure confirmation of triostin A by ^1H - and ^{13}C -Magnetic Resonance. *J. Antibiotics*, 29 (1): 107-110
88. Park, J.Y.; Choi, B.S. (1995) NMR investigation of echinomycin binding to d(ACGTTAACGT)₂: Hoogsteen versus Watson-Crick AT base pairing between echinomycin binding sites. *J. Biochem.*, 118 (5): 989-995
89. Pawilk, J.R. (1993) Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.*, 93: 1911-1922
90. Pazdur, R.; Haas, C.D.; Baker, L.H.; Leichman, C.G.; Decker, D. (1987) Phase I study of Echinomycin. *Cancer Treatment Reports*, 71 (12): 1217-1219
91. Pérez-Baz, J.; Cañedo, L.; Fernández-Puentes, J.L; Silva, M.V. (1997) Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. II. Physico-chemical properties and structure determination. *J. Antibiotics*, 50 (9): 738-741
92. Pommier, Y; Kohlhager, G.; Bailly, C.; Waring, M.; Mazumder, A.; Khon, K.W. (1996) DNA sequence and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by Ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry*, 35: 13303-13309
93. Pospiech, A.; Cluzel, B.; Bietenhader, J.; Schupp, T. (1995) A new *Myxococcus xanthus* gene cluster for the biosynthesis of the antibiotic saframycin Mx1 encoding a peptide synthetase. *Microbiology*, 141: 1793-1803
94. Pospiech, A.; Bietenhader, J.; Schupp, T. (1996) Two multifunctional peptide synthetases and an *o*-methyltransferase are involved in the biosynthesis of the DNA-binding antibiotic and antitumor agent Saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus*. *Microbiology*, 142: 741-746
95. Pridham, T.G.; Gottlieb, D. (1948) The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetes* as an aid for species determination. *J. Bacteriol.*, 56: 107-114
96. Rance, M.J.; Ruddock, J.C.; Pacey, M.S. (1989) UK-63,052 complex, new quinomycin antibiotics from *Streptomyces braegensis* ssp. *japonicus*. Taxonomy,

- fermentation, isolation, characterisation and antimicrobial activity. *J. Antibiotics*, 42 (2): 206-217
97. Rinehart, K.L.; Holt, T.G.; Fregeau, N.L.; Keifer, P.A.; Wilson, G.R.; Perun, T.J.; Sakai, R.; Thomson, A.G.; Stroh, J.G.; Shield, L.S.; Seigler, D.S. (1990) Bioactive compounds from aquatic and terrestrial sources. *J. Nat. Prod.*, 53: 771-792
98. Rinehart, K.L.; Holt, T.G. (1992) Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, 770. Patente USA nº 5,089,273
99. Romero, F.; Espliego, F.; Pérez, J.; G^a de Quesada, T.; Grávalos, D.; de la Calle, F.; Fernández-Puentes, J.L. (1997) Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiotics*, 50 (9): 734-737
100. Shimizu, Y. (1993) Microalgal metabolites. *Chem. Rev.*, 93: 1685-1698
101. Shirling, E.B.; Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16: 313-340
102. Spadari, S.; Petralli-Noy, G.; Focher, F.; Montecucco, A.; Bordoni, T.; Geroni, C.; Giuliani, F.C.; Ventrella, G.; Arcamone, F.; Ciarrocchi, G. (1986) DNA polymerases and DNA topoisomerases as targets for the development of anticancer drugs. *Anticancer Res.*, 6: 935-940
103. Stainer, R.Y.; Doudoroff, M.; Adelberg, E.A. (1981) Cap 7 metabolismo microbiano: biosíntesis. Síntesis de proteínas. En: Microbiología. Editorial Aguilar. 243-300
104. Stobel, R.J.; Nakatsukasa, W.M. (1993) Response surface methods for optimizing *Saccharopolyspora spinosa*, a novel macrolide producer. *J. Industrial Microbiol.*, 11: 121-127
105. Stoerl, K.; Stoerl, J.; Zimmer, Ch.; Lown, J.W. (1993) *FEBS Letters*, 317: 157
106. Stowe, R.A.; Mayer, R.P. (1966) Efficient screening of process variables. *Industrial Engineering Chem.*, 58 (2): 36-41
107. Sutcliffe, J.A.; Gootz, T.D.; Barrett, J.F. (1989) Biochemical characteristics and physiological significance of major DNA topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 2027-2033
108. Take, Y.; Inoye, Y.; Nakamura, S. (1989) Comparative studies of the inhibitory properties of antibiotics on human immunodeficiency virus and avian myeloblastosis virus reverse transcriptases and cellular DNA polymerases. *J. Antibiotics*, 42 (1): 107-115
109. Tewey, K.M.; Rowe, T.C.; Yang, L.; Halligan, B.D.; Liu, L.F. (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, 226: 466-468

110. Tewey, K.M.; Chen, G.L.; Nelson, E.M.; Liu, L.F. (1984) Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.*, 259: 9182-9187
111. Tomita, F.; Takahashi, K.I.; Shimizu, K. (1983) *J. Antibiotics*, 36: 463
112. Tomita, F.; Takahashi, K.I.; Tamaoki, T. (1984) *J. Antibiotics*, 37: 1268
113. Tomita, F.; Takahashi, K.; Tamaoki, T. (1984) Quinocarcin, a novel antitumor antibiotic. III. Mode of action. *J. Antibiotics*, 37: 1268-1272
114. Trowitzsch-Kienast, W.; Irschik, H.; Reichenbach, H.; Wray, V.; Höfle, G. (1988) Isolierung und strukturaufklärung der Saframycine Mx1 und Mx2, neue antitumor-aktive antibiotika aus *Myxococcus xanthus*. *Liebigs Ann. Chem.*, 35: 475-481
115. Umezawa, H.; Maeda, K.; Takeuchi, T.; Okami, Y. (1966) New antibiotics: bleomycin A and B. *J. Antibiotics*, 19: 200-208
116. Van Dyke, M.M. & Dervan, P.B. (1984) Echinomycin binding sites on DNA. *Science*, 225: 1122-1127
117. Van der Auwera, P.; Labbe, M.; Mayberry, W.R.; Fergusson, P.; Lambe, D.W. (1986) Identification of bacterioides by cellular fatty acid profiles: Application to the routine microbiological laboratory. *J. Microbiol. Methods*, 4: 267-275
118. Wakelin, L.P.G. & Waring, M.J. (1976) The binding of Echinomycin to deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 157: 721-740
119. Wang, A.H.J.; Ughetto, G.; Quigley, G.J.; Hakoshima, T.; Van der Marcel, G.A.; Van Bloom, J.H.; Rich, A. (1984) The molecular structure of a DNA-triostin A complex. *Science*, 225: 1115-1121
120. Ward, D.C.; Reich, E.; Goldberg, I.H. (1965) Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotics drugs. *Science*, 149: 1259-1263
121. Waring, M.J. & Wakelin, L.P.G. (1974) Echinomycin: a bifunctional intercalating antibiotic. *Nature*, 252: 653-657
122. Waring, M.J. (1979) Echinomycin, triostin and related antibiotics. En: F.E. Hahn (ed.), *Antibiotics: Mechanism of Action of Antieukaryotic and Antiviral Compounds*, vol. 5, part 2, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 173-194
123. Waring, M.J. (1987) Dynamics aspects of antibiotic-DNA interaction. En: W. Guschlbauer & W. Saenger (eds.), *DNA-ligand Interaction: From drugs to protein*, Plenum Press, New York, pp. 113-126
124. Waring, M.J. (1990) The molecular basis of specific recognition between echinomycin and DNA. En: B. Pullman & J. Jortner (eds.), *Molecular basis of specificity in nucleic acid-drug interactions*. Kluwer, Dordrecht, pp. 225-245

125. *Waring, M.J.* (1993) Echinomycin and related quinoxaline antibiotics. En: S. Neidle & M.J. Waring (eds.), *Molecular aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions*, vol. 1, chapter 7, pp. 213-242
126. *Waksman, S.A.; Woodruff, H.B.* (1940) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 45: 609
127. *Yoshinari, T.; Okada, H.; Yamada, A.; Uemura, D.; Oka, H.; Suda, H.; Okura, A.* (1994) Inhibition of topoisomerase II by a novel antitumor cyclic depsipeptide, BE-22179. *Jpn. J. Cancer Res.*, 85: 550-555

ANEXOS



Serie de matrices empleadas en Respuesta de Superficies: Optimización por el método unidireccional de Hendrix de las cepas *Micromonospora* sps. ML1 y ACM2

CEPA ML1

Tabla 1.- Matriz utilizada en Plackett y Burman

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.35
2	30	40	10	1	10	0.1	5	1.56
3	30	40	1	10	1	1	5	0.22
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.46
5	3	40	1	10	10	0.1	0.5	0.23
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.27
7	3	40	10	1	1	1	0.5	0.56
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.44
9	30	4	1	10	1	0.1	0.5	0.12
10	3	4	10	1	1	0.1	5	0.19
11	3	40	1	1	1	1	5	0.11
12	30	4	1	1	10	1	5	0.13
13	3	4	1	10	10	1	5	0.03
14	3	4	10	10	10	1	0.5	0.03
15	3	40	10	10	10	0.1	5	2.24
16	3	4	1	1	1	0.1	0.5	0.15
X ¹	16.5	22	5.5	5.5	5.5	0.55	2.75	0.095 ²

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.

Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

Reformular: 9x17; 11x18; 12x19; 13x20; 14x21; 16x22

Tabla 2.- Matriz del primer desacarte

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.39
2	30	40	10	1	10	0.1	5	0.81
3	30	40	1	10	1	1	5	0.24
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.53
5	3	40	1	10	10	0.1	0.5	0.11
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.57
7	3	40	10	1	1	1	0.5	0.09
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.39
17	1.2	42.4	10.6	0.4	10.6	1.06	5.3	0.64
18	3	4	10	1	1	0.1	5	0.21
18	31.8	1.6	10.6	10.6	10.6	0.04	0.2	0.08
19	1.2	42.4	10.6	10.6	0.4	0.04	0.2	0.49
20	31.8	42.4	10.6	0.4	0.4	0.04	0.2	0.33
21	31.8	42.4	0.4	0.4	0.4	0.04	5.3	0.16
15	3	40	10	10	10	0.1	5	1.15
22	31.8	42.4	10.6	10.6	10.6	1.06	5.3	0.73
X ¹	20.1	31.6	7.9	5.5	5.5	0.43	2.75	0.148 ²

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.

Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

Reformular: 3x23; 5x24; 7x25; 10x26; 18x27; 21x28

Tabla 3.- Matriz del segundo descarte

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.62
2	30	40	10	1	10	0.1	5	1.20
23	8.9	22.6	15.7	0.4	15.7	0	0.2	0.36
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.11
24	39.5	22.6	15.7	0.4	0.4	0.8	5.3	0.59
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.87
25	39.5	22.6	5.5	10.6	15.7	0	5.3	1.02
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.08
17	1.2	42.4	10.6	0.4	10.6	0.1	0.2	0.25
26	39.5	63.4	5.5	10.6	15.7	0.8	0.2	0.21
27	6.8	66.1	4.8	0	0	0.87	5.6	0.16
19	1.2	42.4	10.6	10.6	0.4	0.04	0.2	0.36
20	31.8	42.4	10.6	0.4	0.4	0.04	0.2	0.77
28	6.8	19.9	16.4	11.3	11.3	0.87	0	0.12
15	3	40	10	10	10	0.1	5	0.98
22	31.8	42.4	10.6	10.6	10.6	1.06	5.3	0.28
X ¹	19.5	35.9	10.4	5.5	7.7	0.35	3.76	0.163 ²

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.

Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

Reformular: 4x29; 8x30; 26x31; 27x32; 28x33; 22x34

Tabla 4.- Matriz del tercer descarte

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.16
2	30	40	10	1	10	0.1	5	0.87
23	8.9	22.6	15.7	0.4	15.7	0	0.2	0.20
29	14	72	10.9	10.6	5.1	0	5.3	0.32
24	39.5	22.6	15.7	0.4	0.4	0.8	5.3	0.50
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.26
25	39.5	22.6	5.5	10.6	15.7	0	5.3	0.04
30	14	31.3	21	10.6	5.1	0.95	5.3	0.88
17	1.2	42.4	10.6	0.4	10.6	1.06	5.3	0.12
31	3.2	36.7	16	0	0	0.16	5.7	0.29
32	40.3	1.6	16.7	11.7	16.4	0.08	0	0.11
19	1.2	42.4	10.6	10.6	0.4	0.04	0.2	0.95
20	31.8	42.4	10.6	0.4	0.4	0.04	0.2	0.19
33	40.3	54	3.6	0	3.6	0.08	5.9	0.54
15	3	40	10	10	10	0.1	5	1.58
34	12	28.5	10.2	0	4.4	0	0	0.33
X ¹	21.2	33.9	11.7	5.4	6.2	0.28	3.39	0.137 ²

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.

Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

Reformular 1x35; 23x36; 25x37; 17x38; 32x39; 29x40

Tabla 5.- Matriz del cuarto descarte

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
35	11.2	22.7	13.6	0.19	12.1	0	6.7	1.21
2	30	40	10	1	10	0.1	5	0.79
36	15.1	43.8	7.2	11.1	5.9	0.60	7	0.20
29	14	72	10.9	10.6	5.1	0	5.3	0.46
24	39.5	22.6	15.7	0.4	0.4	0.8	5.3	0.54
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.37
37	0.5	43.8	18.7	0	12.1	0	1.2	0.44
30	14	11.5	21	10.6	5.1	0.95	5.3	0.21
38	43.9	20	12.9	11.1	1.21	0	1.2	0.62
31	3.2	4.7	16	0	0	0.16	5.7	0.10
39	0	66.2	6	0	0	0.51	7.2	0.19
19	1.2	42.4	10.6	10.6	0.4	0.04	0.2	0.29
40	9.2	20	12.9	11.1	12.77	0.55	7	0.54
33	40.3	54	3.6	0	36	0.08	5.9	0.96
15	3	40	10	10	10	0.1	5	1.33
34	12	28.5	10.2	0	4.4	0	0	0.18
X ¹	17.9	34.8	11.8	5.4	7.2	0.25	5.0	0.196

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.
 Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

Cepa ACM2

Tabla1: Misma matriz que Plackett y Burman

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.139
2	30	40	10	1	10	0.1	5	0.310
3	30	40	1	10	1	1	5	0.095
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.413
5	3	40	1	10	10	0.1	0.5	0.134
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.121
7	3	40	10	1	1	1	0.5	0.144
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.133
9	30	4	1	10	1	0.1	0.5	0.095
10	3	4	10	1	1	0.1	5	0.012
11	3	40	1	1	1	1	5	0.008
12	30	4	1	1	10	1	5	0.009
13	3	4	1	10	10	1	5	0.064
14	3	4	10	10	10	1	0.5	0.043
15	3	40	10	10	10	0.1	5	0.050
16	3	4	1	1	1	0.1	0.5	0.045
X ¹	16.5	22	5.5	5.5	5.5	0.55	2.75	0.028

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.
 Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

Reformular: 10x17; 11x18; 12x19; 14x20; 15x21; 16x22

Tabla 2.- Matriz del primer descarte.

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.126
2	30	40	10	1	10	0.1	5	0.280
3	30	40	1	10	1	1	5	0.028
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.190
5	3	40	1	10	10	0.1	0.5	0.022
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.089
7	3	40	10	1	1	1	0.5	0.122
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.194
9	30	4	1	10	1	0.1	0.5	0.033
17	31.8	42.4	0.4	10.6	10.6	1.06	0.2	0.156
18	31.8	1.6	10.6	10.6	10.6	0.04	0.2	0.153
19	1.2	42.4	10.6	10.6	0.4	0.04	0.2	0.030
13	3	4	1	10	10	1	5	0.030
20	31.8	42.4	0.4	0.4	0.4	0.04	5.3	0.042
21	31.8	1.6	0.4	0.4	0.4	1.06	0.2	0.040
22	31.8	42.4	10.6	10.6	10.6	1.06	5.3	0.031
X ¹	23.7	26.8	5.5	6.7	5.5	0.55	2.15	0.029

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.

Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

Reformular: 3x23; 5x24; 9x25; 19x26; 13x27; 22x28

Tabla 3.- Matriz del segundo descarte

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.112
2	30	40	10	1	10	0.1	5	0.227
23	16.56	11.84	10.6	2.96	10.6	0.04	0	0.063
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.188
24	47.16	11.84	10.6	2.96	0.4	1.06	4.02	0.026
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.099
7	3	40	10	1	1	1	0.5	0.056
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.079
25	16.56	52.64	10.6	2.96	10.6	1.06	4.02	0.094
17	31.8	42.4	0.4	10.6	10.6	1.06	0.2	0.021
18	31.8	1.6	10.6	10.6	10.6	0.04	0.2	0.106
26	50.4	9.12	0	2.28	11.28	1.13	4.36	0.072
27	47.16	52.64	10.6	2.96	0.4	0.04	0	0.078
20	31.8	42.4	0.4	0.4	0.4	0.04	5.3	0.025
21	31.8	1.6	0.4	0.4	0.4	1.06	0.2	0.030
28	14.52	9.12	0	2.28	0	0	0	0.025
X ¹	29.5	25.2	6.6	3.9	5.5	0.55	1.89	0.031

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.

Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

Reformular: 24x29; 7x30; 17x31; 20x32; 21x33; 28x34

Tabla4: Matriz del tercer descarte.

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.091
2	30	40	10	1	10	0.1	5	0.145
23	16.56	11.84	10.6	2.96	10.6	0.04	0	0.150
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.610
29	9.56	40.34	2.01	3	11.2	0	0	0.060
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.322
30	59.61	8.43	2.7	7.2	10.6	0.04	3.4	0.061
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.094
25	16.56	52.64	10.6	2.96	10.6	1.06	4.02	0.125
31	31.8	42.4	0.4	10.6	10.6	1.06	0.2	0.042
18	31.8	1.6	10.6	10.6	10.6	0.04	0.2	0.135
26	50.4	9.12	0	2.28	11.28	1.13	4.36	0.092
27	47.16	52.64	10.6	2.96	0.4	0.04	0	0.014
32	27	5.7	13.6	7.9	11.2	1.13	0	0.018
33	27	51.9	13.6	7.9	11.2	0	3.8	0.029
34	46.35	43.4	14	5.7	11.7	1.17	4.04	0.058
X ¹	32.1	24	8.1	5.6	8.9	0.50	1.97	0.037

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.

Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

Sustituir: 29X35 ; 31X36 ; 27X37 ; 32X38 ; 33X39 ; 34X40

Tabla5: Matriz del cuarto descarte.

	Glu	Alm	Lev	Mal	Pep	HK ₂ PO ₄	CaCO ₃	PAT
1	30	40	10	10	1	1	0.5	0.220
2	30	40	10	1	10	0.1	5	0.098
23	16.56	11.84	10.6	2.96	10.6	0.04	0	0.194
4	30	4	10	1	10	1	0.5	0.099
35	57.7	14	15	6.2	6.2	1.07	4.2	0.214
6	30	4	10	10	1	0.1	5	0.100
30	59.61	8.43	2.7	7.2	10.6	0.04	3.4	0.397
8	30	40	1	1	10	0.1	0.5	0.039
25	16.56	52.64	10.6	2.96	10.6	1.06	4.02	0.138
36	32.5	11.7	16.8	0	6.9	0	3.9	0.261
18	31.8	1.6	10.6	10.6	10.6	0.04	0.2	0.088
26	50.4	9.12	0	2.28	11.28	1.13	4.36	0.029
37	15.1	0.1	3.3	8.3	18.4	1.02	4.2	0.003
38	37.9	53.3	1.9	2.9	6.2	0	4.2	0.083
39	37.9	0.9	1.9	2.9	6.2	1.07	0	0.025
40	15.8	10.5	1.4	5.4	5.7	0	0	0.039
X ¹	32.6	18.9	7.4	4.7	9.1	0.48	2.50	0.036

Todos los valores en g/l. X¹: Medias aritméticas de cada variable²: media PAT de los 6 peores valores.

Glu (Glucosa) Alm (Almidón) Lev (Levadura) Mal (Extracto de malta) Pep (Peptona)

- Resultados completos obtenidos en adiciones de grupos análogos (ANA-1 y ANA-2) sobre caldos de *Micromonospora sp.* ML1 y *Micromonospora sp.* ACM2

REF	HORAS	ML1			ACM2		
		mg/l ¹	IC ₅₀	PAT	mg/l ¹	IC ₅₀	PAT
CONTROL	72	80	4.3	18.6	95	6.8	14
"	96	110	2	55	110	2.5	44
"	144	90	2	45	110	4.8	22.9
"	192	145	8.4	17.3	90	25.8	3.5
ANA-1							
0.25mM	72	135	30	4.5	75	30	2.5
"	96	105	4.2	25	115	9.3	12.3
"	144	120	2.8	42.9	85	2.1	40.8
"	192	120	2.5	48	125	3.5	35.7
5 mM	72	105	18	5.8	70	22	3.2
"	96	90	3.5	25.7	160	18.1	28.8
"	144	150	3.8	39.5	100	2.4	41.4
"	192	245	8.8	27.8	105	4.5	23.3
ANA-2							
0.25Mm	72	75	8.3	9	90	32	2.8
"	96	100	11.3	8.8	105	8.8	11.9
"	144	225	4.8	46.9	95	1.8	52.8
"	192	170	2.9	58.6	110	1.8	61.1
2 mM	72	100	8.6	11.6	125	48	2.6
"	96	130	5.5	23.6	140	9.5	14.7
"	144	130	2.2	59.1	135	6.4	21.1
"	192	220	3	73.3	330	7.5	44
5 mM	72	160	22.5	7.1	180	25.5	7
"	96	580	>75	<7.7	175	25	7
"	144	170	4.7	36.1	210	9.4	22.3
"	192	170	3.9	43.6	225	8.8	25.6

¹mg extracto/litro medio. ² IC50 en µg/ml.

- Resultados completos obtenidos en adiciones de aminoácidos sobre caldos de *Micromonospora sp.* ML1 y *Micromonospora sp.* ACM2

L-glicina

REF.	HORAS	ML1			ACM2		
		mg/l ¹	IC ₅₀ ²	PAT	mg/l ¹	IC ₅₀ ²	PAT
CONTROL	96	105	2.1	50	120	2.4	50
"	144	115	2.5	46	100	3.6	27.8
"	192	80	13	6.2	90	20	4.5
0.25mM	96	105	1.9	55.2	105	2.6	40.4
"	144	90	2	45	100	3.4	29.4
"	192	80	14	5.7	90	21.5	4.2
2 mM	96	90	1.6	56.3	100	2.6	38.5
"	144	85	0.8	106.3	90	1.2	75
"	192	70	8.5	8.2	350	8.5	41.1
5 mM	96	115	2.7	42.6	85	6.5	13
"	144	75	10	7.5	100	6	16.7
"	192	55	14	3.9	320	58	5.5

¹mg extracto obtenido por litro de caldo. ²en µg/ml

L-tirosina

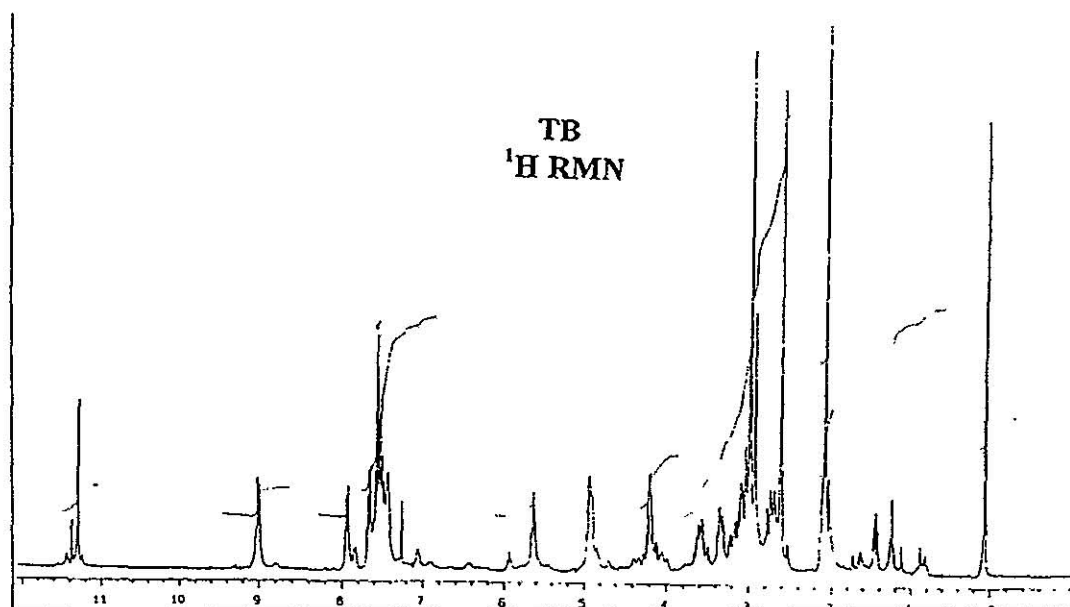
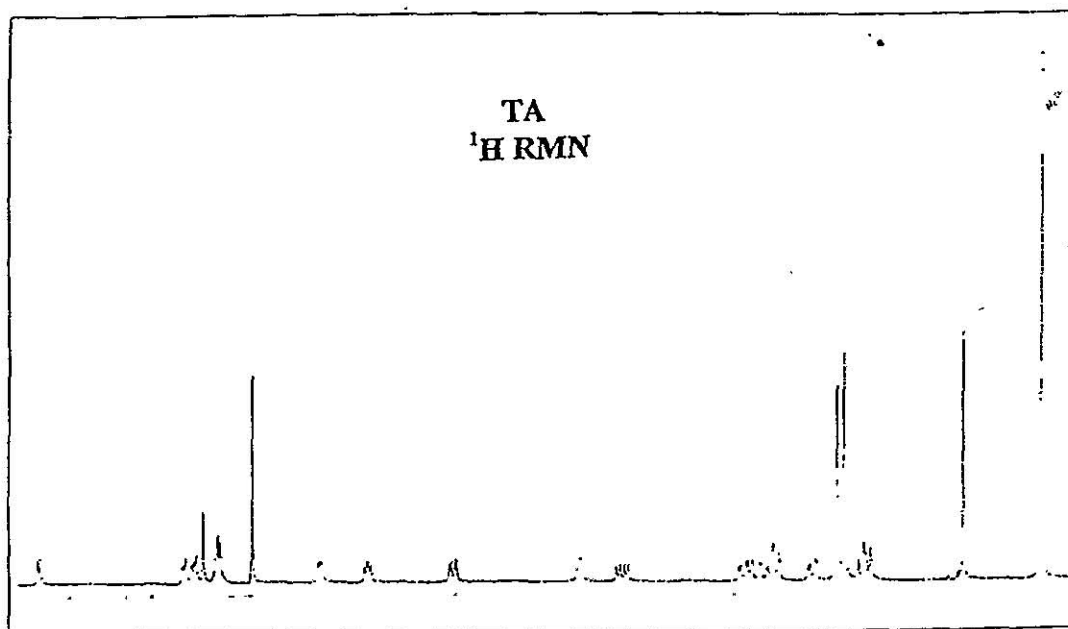
REF	HORAS	ML1			ACM2		
		mg/l	IC ₅₀	PAT	mg/l	IC ₅₀	PAT
CONTROL	96	110	1.8	61.1	115	2.5	46
"	144	105	2.3	45.7	105	3.5	30
"	192	135	4	33.7	90	3.5	2.6
0.25mM	96	125	2.3	54.3	120	8.5	14.1
"	144	70	4	17.5	90	9.5	9.5
"	192	135	4.5	17	130	36	3.6
2 mM	96	110	1.8	61.1	100	7.8	12.8
"	144	65	4	16	80	16	5
"	192	445	4.5	17	105	41	2.6
5 mM	96	125	2.6	48.1	85	7	12.1
"	144	85	7.5	11.3	110	22.5	4.9
"	192	155	8.5	18.2	120	15	8

L-triptófano

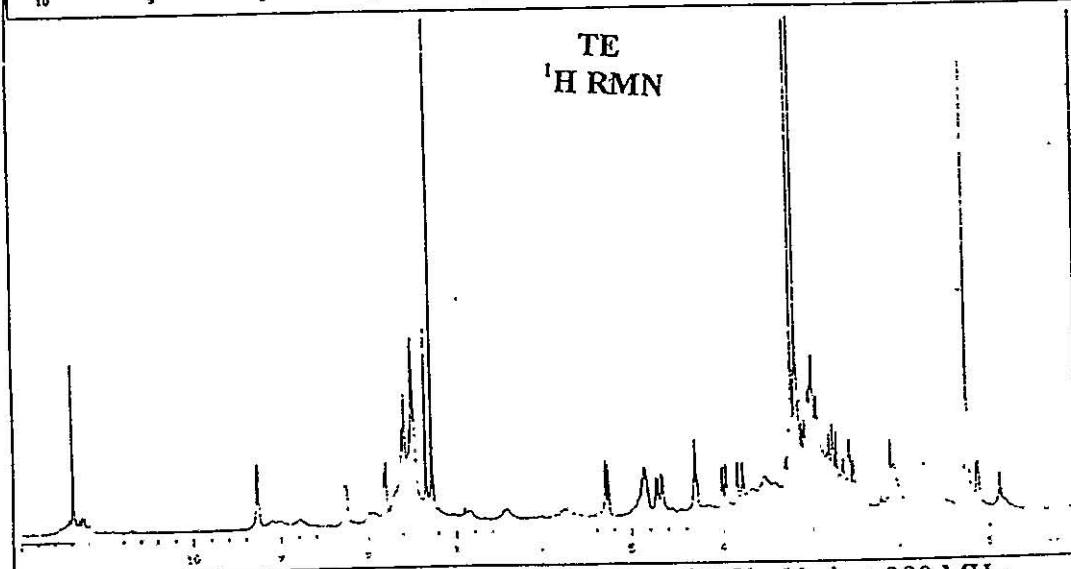
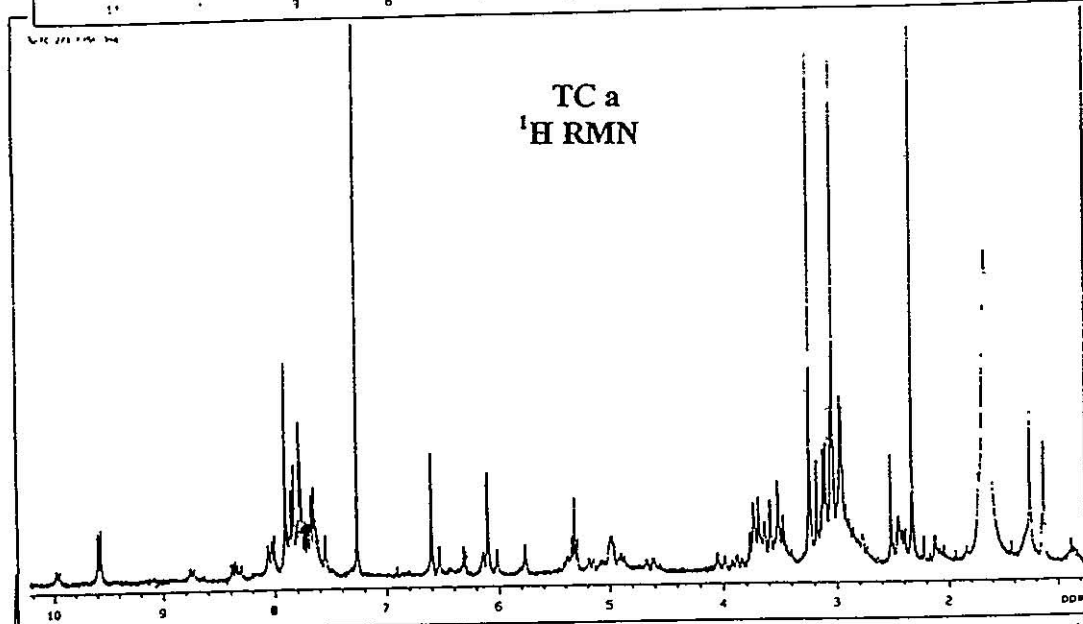
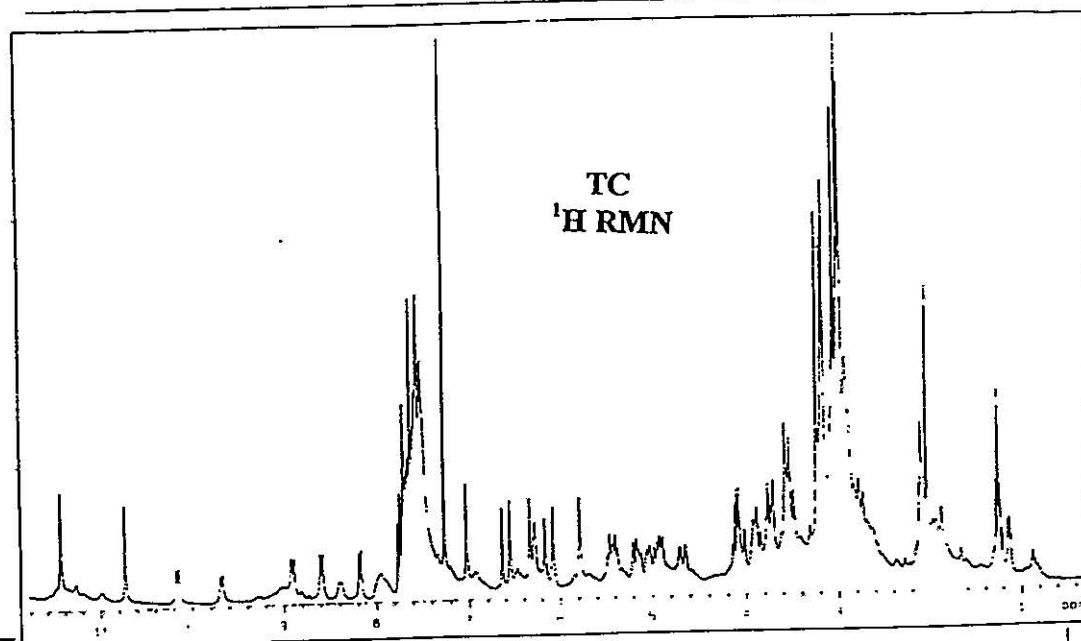
REF	HORAS	ML1			ACM2		
		mg/L	IC ₅₀	PAT	mg/L	IC ₅₀	PAT
CONTROL	96	110	2	55	130	2.5	52
"	144	145	3.5	41.4	565	24	23.5
"	192	435	30	14.5	100	6.8	14.7
0.25mM	96	115	2	57.5	495	8.4	58.9
"	144	135	3	45	170	2.6	65.4
"	192	535	24	22.3	160	6.3	25.4
2 mM	96	145	2.4	60	160	2.1	76.2
"	144	170	3	57	630	7.5	84
"	192	725	18	40.2	210	6.8	30.9
5 mM	96	245	2.6	94.2	220	2.6	84.6
"	144	350	4.5	77.8	280	3.3	84.8
"	192	265	3.5	75.7	700	11.4	61.4

L-Cisteína

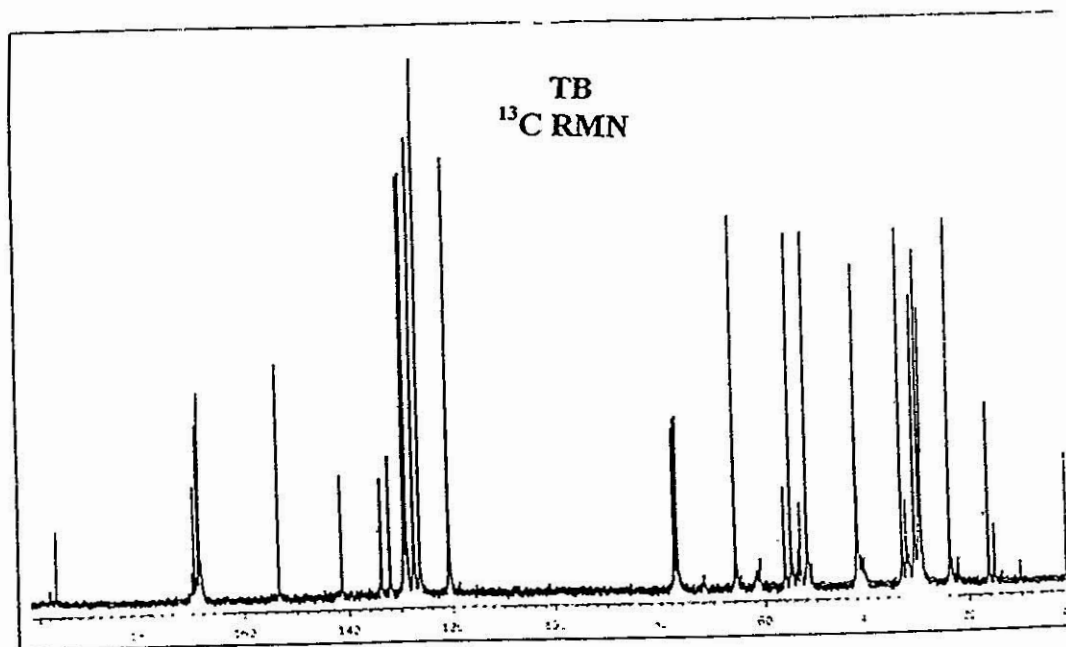
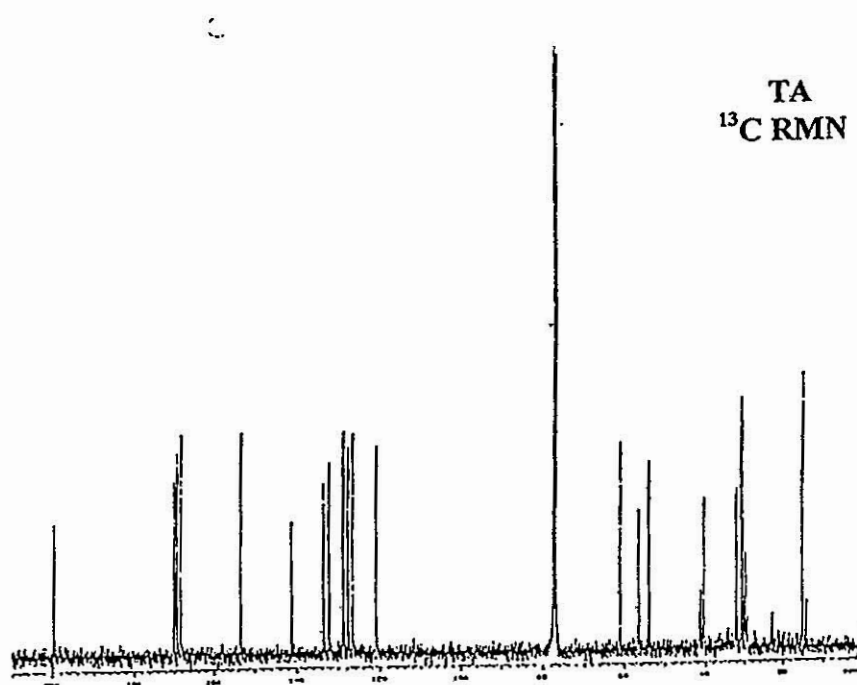
REF	HORAS	ML1			ACM2		
		mg/L	IC ₅₀	PAT	mg/L	IC ₅₀	PAT
CONTROL	72	80	4.3	18.6	95	6.8	14
"	96	110	2	55	110	2.5	44
"	144	90	2	45	110	4.8	22.9
"	192	145	8.4	17.3	90	25.8	3.5
0.25mM	72	105	7.4	14.2	190	16	11.9
"	96	130	13.3	9.8	130	35	3.7
"	144	100	3.3	30.3	155	2.7	57.4
"	192	100	7	14.3	95	1.8	52.8
2 mM	72	80	21.5	3.7	110	16.8	6.5
"	96	70	25.5	2.7	100	28.5	3.5
"	144	80	5.5	14.5	125	1.8	69.4
"	192	95	1.8	52.8	115	2.2	52.3
5 mM	72	65	21.8	3	80	18	4.4
"	96	75	18.1	4.1	90	26	3.5
"	144	90	5.8	15.5	90	0.9	100
"	192	200	7.3	27.4	235	3.7	63.5

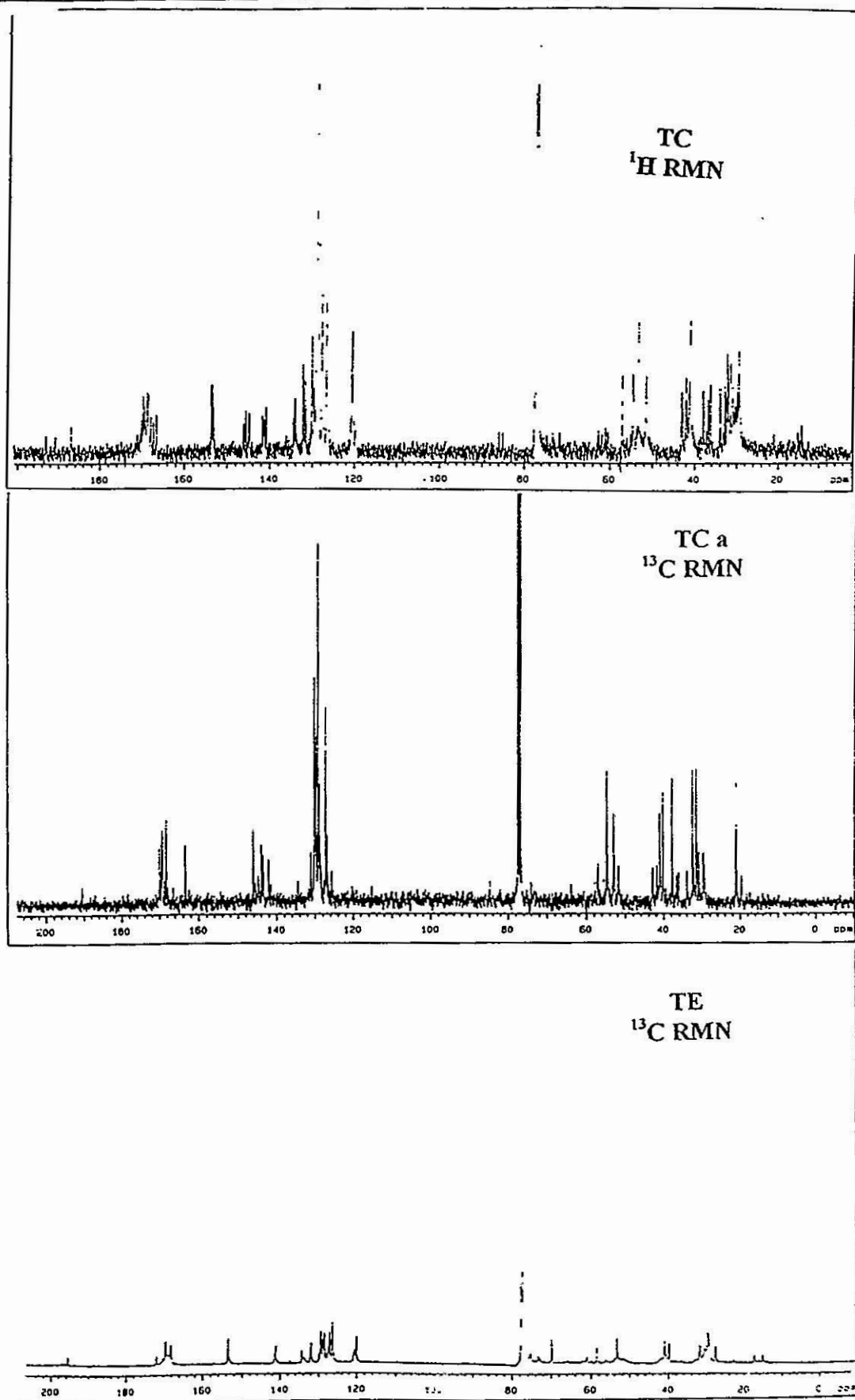


Espectros ^1H RMN de tiocoralinas A y B en CDCl_3 . Variant 300 MHz



Espectros ^1H RMN de tiocoralinas C, Ca y E en CDCl_3 , Variant 300 MHz





Espectros ^{13}C RMN de tiocoralinas C, Ca (C acetilada) y E en CDCl_3 . Variant 300 MHz